



**Syddansk Universitet**

## **Proceskædens indflydelse på ginsenosider, polyacetylenier og polysakkarider i amerikansk ginseng**

Jensen, Martin; Christensen, Lars Porskjær ; Giessing, Anders; Mutenda, Kudzai; Roepstorff, Peter

*Publication date:*  
2006

*Document Version*  
Også kaldet Forlagets PDF

[Link to publication](#)

*Citation for published version (APA):*

Jensen, M., Christensen, L. P., Giessing, A., Mutenda, K., & Roepstorff, P. (2006). Proceskædens indflydelse på ginsenosider, polyacetylenier og polysakkarider i amerikansk ginseng: Et projekt fra UdviklingsCenter Aarslev. Danmarks JordbrugsForskning ; Udviklingscenter Årslev.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

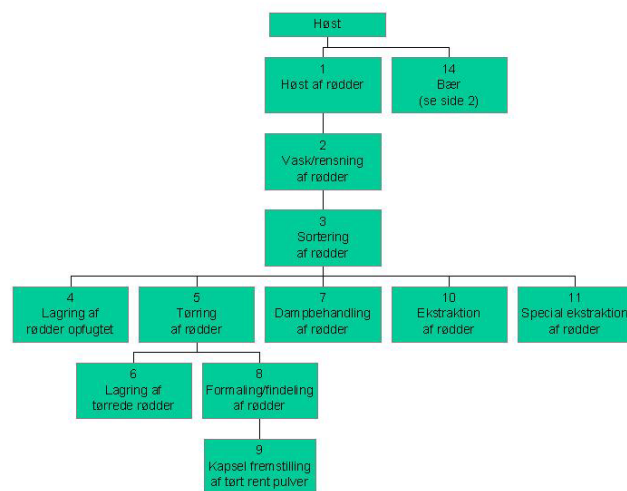
- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# Proceskædens indflydelse på ginsenosider, polyacetylenere og polysakkarider i amerikansk ginseng.

Et projekt fra UdviklingsCenter Aarslev.



## Slutrapport

Martin Jensen<sup>1</sup>, Lars Porskjær Christensen<sup>2</sup>, Anders Giessing<sup>3</sup>, Kudzai E. Mutenda<sup>3</sup> og Peter Roepstorff<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Afdeling for Havebrugsproduktion, Danmarks JordbrugsForskning, Kirstinebjergvej 10, 5792 Årlev. <sup>2</sup> Afdeling for Råvarekvalitet, Danmarks JordbrugsForskning, Kirstinebjergvej 10, 5792 Årlev. <sup>3</sup> Afdeling for Biokemi og Molekylær Biologi, Syddansk Universitet, Campusvej 55, 5230 Odense M.

# Indhold

Introduktion.....	3
Baggrund og perspektiv .....	3
Formål .....	3
Generelle metoder.....	4
Forarbejde og planlægning.....	4
Optagning og vask af rødder .....	4
Samplingsmetoder for råvarer.....	4
Behandlinger:.....	5
Parceludbytter og rodvægtfordeling .....	7
Ginsenosider og polyacetylenr.....	9
Ekstraktion og kvantificering af polyacetylenr og ginsenosider i ginseng ekstrakter .....	9
Resultater for ginsenosider og polyacetylenr .....	10
Firmaprøver fra Kongshave Ginseng .....	19
Tørningsforsøg fra diplomstudiet .....	20
Ginseng rødder – valg af tørningsmetode har ikke stor betydning for indholdet af bioaktive stoffer.....	20
<b>Forarbejdning</b> .....	20
<b>Tørningsforsøg</b> .....	21
<b>Effekt af tørring på indhold af bioaktive stoffer</b> .....	22
Polysakkarider og ginsenosider med sukkergrupper .....	25
Electrospray MS identifikation af aktive komponenter i vandige ginsengekstrakter. ....	25
Prøveforberedelse.....	25
Metode.....	26
Resultater .....	26
Råprøver .....	26
Proceskæde-behandlingsprøver.....	30
Opsummering.....	30
Litteratur.....	35
Konklusion og videre perspektiver .....	35
Videre formidling.....	36
Acknowledgement.....	36

# Introduktion

## Baggrund og perspektiv

Optimal bevarelse af de bioaktive indholdsstoffer fra råvarehøst gennem proceskæden frem til den færdige råvare til drogefremstilling, er afgørende for kvalitet og økonomi i produktion af råvaren.

For ginseng er der en række kendte bioaktive stoffer, som ønskes bevaret, herunder ginsenosider (immunforsvar og diabetes II effekt), polyacetylenier (kræftforebyggelse) og polysakkarider (diabetes effekt). Den biokemiske stabilitet af disse stoffer kan være forskellig og det er ikke belyst hvordan de forskellige trin i en almindelig håndtering af ginseng påvirker disse stoffers koncentration og om der f.eks. sker en ændring i fordelingen mellem de forskellige typer ginsenosider, polyacetylenier eller polysakkarider. De eksisterende undersøgelser over processers indvirkning på indholdsstofferne tager ofte kun udgangspunkt i én stofgruppe i en allerede tørret rod og beskriver oftest kun ændringer over et eller få procesled og ikke gennem hele kæden.

Hvis man skal sikre et optimalt produkt efter processing er det derfor nødvendigt at kende til det samlede koncentrationsflow igennem processerne og klargøre hvilke metoder i de enkelte delprocesser, der bedst sikrer bevarelse af de aktive stoffer. På denne baggrund vil det være muligt at sikre et 'fuldt' ginseng produkt med alle effekter, eller alternativt at optimere bevarelse af den stoftype man er særligt interesseret i til et specifikt produkt.

Både for en kommende dansk råvare produktion men også for danske farmaceutiske firmaer, der producerer plantemedicin eller kosttilskud, vil denne viden være af stor interesse, da det vil være en slags drejebog/protokol for hvordan proceshåndteringen gøres optimalt for at sikre bedst mulig kvalitet i slutprodukter. Udover den nationale værdi, vil denne viden være interessant som 'eksportvare' og kunne implementeres i samarbejde mellem danske farmaceutiske firmaer og udenlandske råvareproducenter, eks kinesiske eller nordamerikanske ginseng dyrkere for at optimere totaludbyttet og kvalitet fra høst til den droge, som danske firmaer indkøber. Viden vil her kunne bygges ind i GAP/GMP regler, og dermed få praktisk konsekvens og betydning for avler - producent kæden. En analyse af de tre stofgruppers forekomst i udvalgte markedsførte danske produkter vil være interessant til sammenligning med råvarens indhold for at vurdere potentialet for fremtidige forbedringer. Projektet vil være et trin på vejen mod fremstilling af nye ginsengprodukter med stærkere specificerede egenskaber og indholdsstoffer, herunder mulighed for renfremstillede stoffer til medicin/plantemedicin anvendelse i fremtiden.

## Formål

Formålet med projektet er at vise hvordan de tre bioaktive stofgrupper i ginseng ændrer sig samtidigt gennem proceskæden, så en optimal håndtering i forhold til bevarelse af de aktive stoffer kan anbefales, herunder at teste enkelte ginsengprodukter/råvarers indhold.

# Generelle metoder

## Forarbejde og planlægning

Der blev afholdt indledende planlægningsmøder mellem partnerne, hvor en række detaljer blev aftalt. Der blev straks sendt prøver af ginseng til SDU BMB for at udvikle og indkøre standardanalysemetoden for polysakkarider i projektet. Netop polysakkariderne er ikke fuldt karakteriseret i ginseng endnu og arbejdet skulle derfor forsøge at identificere de mulige forskellige stoffer, herunder de ginsenosider, der indeholder flere sukkergrupper. Da metoder og apparatur til at analysere meget langkædede polysakkarider ikke var til stede på SDU fokusere vil projektet her primært fokusere på de mere kortkædede polysakkarider. For ginsenosider og polyacetylenere var målemetoden færdigudviklet og apparatur sat op til analyser.

## Optagning og vask af rødder

Friske 7-årige rødder af amerikansk ginseng (*Panax quinquefolium* L.) blev forsigtigt gravet op i april i en række delparceller a 1 m<sup>2</sup>. Antal rødder og friskvægt af rødder pr m<sup>2</sup> bed blev registreret som baggrundsreference til analyserne. Parceludbytter og rodvægtfordelingen er vist i tabel 1 og figur 1. Dårlig kvalitet rødder, f.eks. svampeinficerede eller misfarvede blev frasorteret.

De optagne rødder blev spulet og børstet let for at fjerne al jord. Mindre og mellemstore siderødder, der krydsede blev brækket let fra hinanden for at sikre helt rene rødder til analyser. Herefter blev rødderne lagt til overfladetørring i ca. 20-30 minutter ved ca. 15-18°C. Derefter vejedes friskvægten af rødderne og antal oprindelige hele rødder blev noteret for hver parcel. De blev herefter pakket i foldede rene og kraftige plastposer for at sikre iltadgang men reducere fordampning og lagt på køl.

## Samplingsmetoder for råvarer

Der var planlagt i alt 21 behandlinger, hvoraf lagringsbehandlingerne af tidsmæssige og økonomiske årsager ikke kunne analyseres indenfor dette projekt. Hver behandling bestod af 2 ægte gentagelser (tidsforskudte uafhængige behandlinger) a ca. 130 g friske rødder, der igen var opdelt i 2 replikative gentagelser a ca. 66 g frisk rod. Der var dermed behov for ca. 5,46 kg rødder i alt.

For at sikre at enkeltrødder eller parceller ikke var konfunderet med behandlingseffekter, var det nødvendigt at gennemføre en minutøs sampling procedure. Tilfældigt udvalgte og mange rødder fra alle parceller blev skåret i mindre stykker a maksimalt 5-8 g og enkeltstumper fra samme rod lagt i forskellige foliebakker. Finrødder blev lagt i bakke for sig. Herefter blev rodstumper i den enkelte bakke blandet godt sammen. Så blev der til hver prøve udtaget 1 rodstump fra de enkelte bakker og med normal repræsentation af alle rodstørrelser indtil basisvægten på ca. 66 g frisk rodmasse (svarer til ca. 18 g tørstof) var opnået.

Et behandlingsparti indeholdt derfor typisk op til 12-18 rodstumper fra mange rødder, hvorved forskelle i indholdskoncentrationer mellem enkeltrødder ville få lille indflydelse på behandlingsresultaterne. Under sampling blev rødderne beskyttet så meget som muligt mod udtørring. Efter sampling blev rodfriskvægten pr replikat/pose vejet og rødder placeret i tillukkede (let ilt diffusion mulig) kraftige plastposer i kølerum ved 2°C.

Behandlinger:

Behandlingerne blev startet så hurtigt som muligt efter sampling, i praksis inden for få dage. De 4 enkelte prøver til hver behandling blev udtaget tilfældigt til de enkelte behandlinger og blev behandlet sammen 2 og 2, således at enkeltgentagelser kunne identificeres klart. Hver prøve blev vejet før og efter behandling for at kende procesændringer i vægt og vandindhold.

For de behandlinger, der påvirkede vandindholdet, blev der, efter færdig behandling og før udtagning til analyser, gennemført måling af vandindhold med fire prøver a mellem 0,5 og 1 grams størrelse og disse prøver blev tørret i ovn ved 80°C i 2 døgn. Vandindholdet i analyseprøven er vigtige da de skal bruges til at sammenligne slutkoncentrationer på samme tørstofbasis.

Detailbehandlinger

1. Kontrol. Friske nyopgravede, 'vaskede' rødder blev analyseret efter få dage på køl ved 2°C.
2. Friske hele rødder (som 1.) blev frosset ved -20°C i 7 døgn i helt lukkede tykke plastposer og derefter analyseret.
- 3.1. Friske hele rødder blev pakket helt tæt i tykke plast poser, og derefter lagret ved -20°C i 6 måneder.
- 3.2. Friske hele rødder blev pakket i tykke plastposer (let adgang for iltskifte) og lagret ved 4°C i 6 måneder.
- 3.3 Friske hele rødder blev pakket i tykke plastposer (let adgang for iltskifte) og lagret ved 20°C i 6 måneder
- 4.1. Lufttørring hele rødder i foliebakker (7 dage ved 38°C, ventileret 'hyldetørring', i tørreskab)
- 4.2. Lufttørring af fint snittede rødder (proces-rivejern) (7 dage ved 38°C, ventileret hyldetørring, i tørreskab)
- 4.3. Frysetørring af hele friske rødder (er en del af Trine Nordqvists diplom studie, se senere)

#### 4.4. Frysetørring af fint snittede rødder (proces-rivejern)

5.1 Lagring af tørrede (38°C i 7 dage) hele rødder i hermetiske tykke plast poser ved -20°C i 6 mdr.

5.2 Lagring af tørrede (38°C i 7 dage) hele rødder i hermetiske tykke plast poser ved +4°C i 6 mdr.

5.3 Lagring af tørrede (38°C i 7 dage) hele rødder i hermetiske tykke plast poser ved 20°C i 6 mdr.

6. Tørring af rødder som i 4a og derefter pulverisering i mølle af de tørre rødder til fint ginseng 'mel'.  
Prøver gemmes i lukkede tykke plastposer på -20°C umiddelbart efter formaling indtil analyse.

7.1 Lagring af tørre pulveriserede rødder i hermetisk lukkede tykke plastposer ved -20°C i 6 mdr.

7.2 Lagring af tørre pulveriserede rødder i hermetisk lukkede tykke plastposer ved +4°C i 6 mdr.

7.3 Lagring af tørre pulveriserede rødder i hermetisk lukkede tykke plastposer ved 20°C i 6 mdr.

7.4 Lagring af tørre pulveriserede rødder i åbne plastposer med iltadgang ved -20°C i 6 mdr.

7.5 Lagring af tørre pulveriserede rødder i åbne plastposer med iltadgang ved +4°C i 6 mdr.

7.6 Lagring af tørre pulveriserede rødder i åbne plastposer med iltadgang ved 20°C i 6 mdr.

8.1 Dampbehandling (autoklaving) af friske rødder i 2 timer ved 120°C og 1 atmosfærestryk og derefter straks frosset ved -20°C i lukkede beholdere.

8.2 Dampbehandling af friske rødder i 2 timer ved 120°C og derefter tørring af rødder i 7 dage ved 38°C.

Udover de 21 behandlinger ovenfor blev der af en diplomingeniørstuderende på IOT, Trine Nordqvist, som blev tilknyttet projektet med en afgangsupgave, analyseret tre forskellige tørringstemperaturer nemlig 30, 38 og 55°C samt frysetørring af hele rødder på samme rodsamlingspartier, som ovenfor. Resultaterne kan ses i bilaget, som er kopi af artikel til Projektavis 4 ved Udviklingscenter Årsløv, efterår 2006.

Herudover blev 4 bærprøver som følgende analyseret ved SDU (tilsvarende prøver er tidligere analyseret for ginsenosider og polyacetylenier hos DJF i det tidligere ginseng VTU/Fyns Amt projekt):

- 10.1 Hele fuldmodne bær høstet i 2005 og lagret hermetisk pakket ved -20°C til analyse tidspunkt.
- 10.2 Rød yderskal fra bær - parti 2 (pericarp) gemt på -20°C
- 10.3 Hele bær fra parti 2 gemt som 10.2.
- 10.4 Pressesaft fra hele bær fra parti 2 gemt som 10.2

Prøverne blev analyseret for ginsenosider og polyacetylenier hos DJF – Afd. for Råvarekvalitet og for polysakkarider hos SDU BMB.

## Parceludbytter og rodvægtfordeling

Tabel 1. Antal rødder og total friskvægt pr parcel af 7-årige amerikanske ginseng rødder.

Parcel nr.	antal rødder	friskvægt g	gns rodvægt/parcel
1	19	1161,2	61,12
2	25	2188,1	87,52
3	26	2623,4	100,90
4	21	2009,9	95,71
5	24	2866,9	119,45
6	28	3051,5	108,98
sum	143	13901	97,21
gns	23,83	2316,83	95,61
std	3,31	690,30	20,15





Figur 1. Fordeling af rodstørrelser i rødder fra forsøgsparceller anvendt til undersøgelser af behandlingseffekter. Rødderne er sorteret efter faldende rodvægt mod højre.

Table 2. Frisk rodmasse før behandling og vandindhold i materialer efter færdig processing af enkelte behandlinger.

Behandlingsnr.	gns. friskvægt pr gentagelse, g	gns. vandindhold (fv basis). %
1	66,62	74,14
2	67,93	74,14
3.1	67,06	74,14
3.2	66,43	74,14
3.3	66,93	74,14
4.1	66,22	4,34
4.2	68,50	3,96
4.3	67,95	
4.4	66,14	1,06
5.1	67,60	4,29
5.2	67,97	4,31
5.3	68,75	3,96
6	67,85	4,26
7.1	67,30	4,12
7.2	67,87	3,98
7.3	68,45	3,96
7.4		3,99
7.5		4,01
7.6		3,97
8.1	67,10	74,14
8.2	67,43	7,79

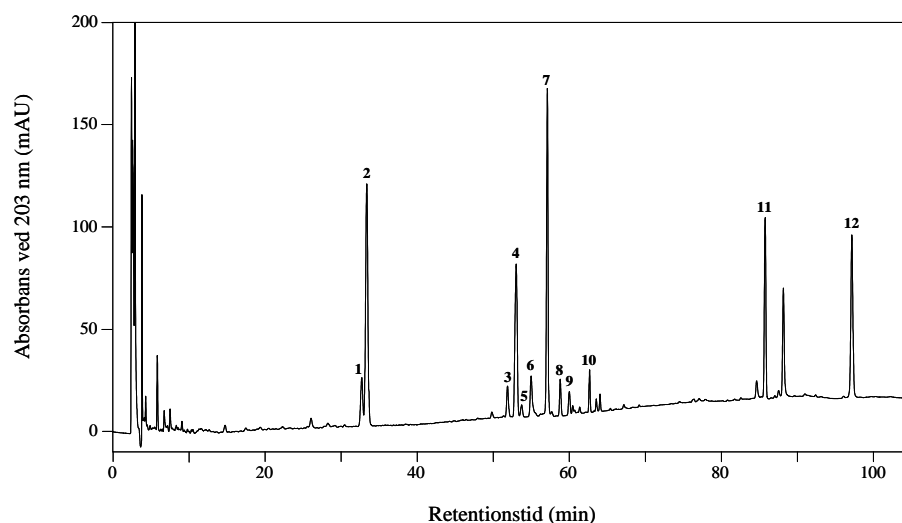
# Ginsenosider og polyacetylenere

## Analysemetoder til ginsenosider og polyacetylenere

Ekstraktion og kvantificering af polyacetylenere og ginsenosider i ginseng ekstrakter

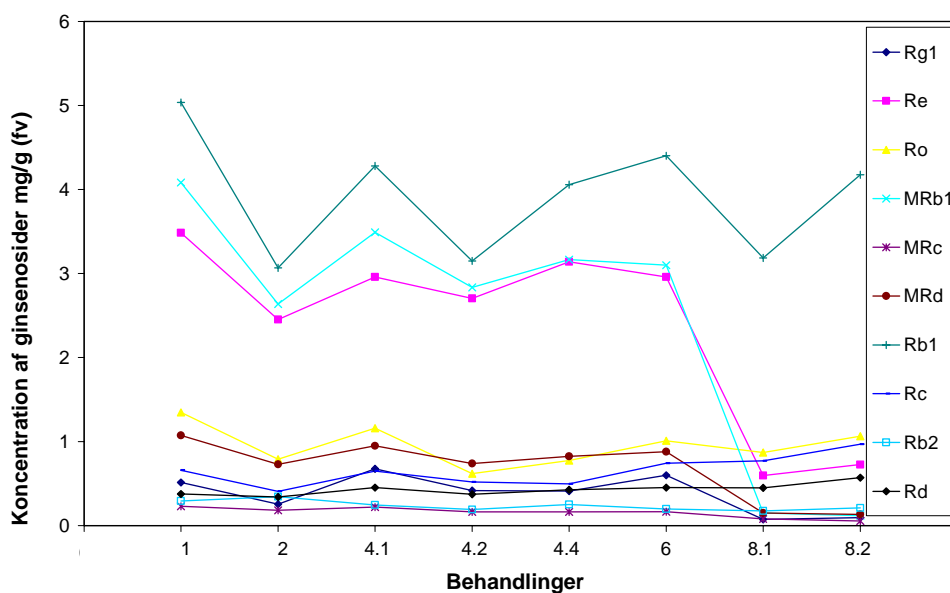
Til ekstraktion af ginsengrødder benyttedes en ekstraktionsmetode, som blev udviklet i det tidligere ginsengprojekt, som er i stand til effektivt at ekstrahere både polyacetylenere og ginsenosider fra ginsengrod materiale på trods af ginsenosidernes og polyacetyleneres forskellige kemiske strukturer og opløselighedsforhold. Desuden er analysemetoden til simultan analyse for ginsenosider og polyacetylenere blevet forbedret således at man nu også kan bestemme indholdet af malonylerede ginsenosider i ginsengrod ekstrakter (se nedenfor). Friske eller tørrede ginsengrødder blev findelt og en repræsentativ prøve blev herefter nøjagtig afvejet på ca. 8 g (frisk plantemateriale) eller 2 g (tørret plantemateriale) i en 100 ml bluecap flaske med skruelåg og findelt yderligere med en Ultra-Turrax T25 sammen med 30 ml 100 % methanol, hvorefter ekstraktet/prøven fik lov at henstå natten over i mørke ved stuetemperatur under omrøring. Herefter blev ekstraktionsvæsken (100 % methanol) dekanteret fra over i en 100 ml målekolbe. Prøven blev efterfølgende ekstraheret med yderligere 30 ml 100 % methanol og 30 ml 80 % vandig methanol efter samme procedure som beskrevet ovenfor. Ekstraktionsvæskerne blev dekanteret over i den samme 100 ml målekolbe og den samlede volumen af ginsengrod ekstraktet justeret til præcis 100 ml med 100 % methanol. Fra det samlede ekstrakt blev udtaget ca. 1.5 ml til HPLC ('High-Pressure Liquid Chromatography') analyse for polyacetylenere og ginsenosider ved at filtrerer det samlede ekstrakt gennem et 0.45 µm HPLC filter ned i et 2 ml brunt HPLC glas. Alle ekstraktioner blev lavet i duplikater eller triplikater.

Ginsengekstrakterne blev analyseret ved analytisk HPLC ved en ny udviklet metode, som både er i stand til at separerer ginsenosider og polyacetylenere i samme analyse. Et analytisk HPLC kromatogram fra analysen af et kombineret methanol/80 % methanol ekstrakt af friskt ginsengrod materiale er vist i **Figur 1** og viser både tilstedeværelsen af polyacetylenere (falcarinol og panaxydol) og forskellige typer af ginsenosider, herunder ginsenosider tilhørende protopanaxadiol-gruppen (Rb1, Rb2, Rc, Rd, m-Rb1, m-Rc, og m-Rd) og protopanaxatriol-gruppen ( $R_e$  og  $R_{g1}$ ). Strukturen af de enkelte ginsenosider og polyacetylenere blev identificeret i HPLC kromatogrammet med autentiske standarder isoleret fra tidligere projekter. Kvantificeringen af polyacetylenere og ginsenosider blev foretaget ud fra kalibreringskurver lavet ud fra de autentiske standarder. Betingelserne for analysen af ginsenosider og polyacetylenere er angivet i **Figur 1**.



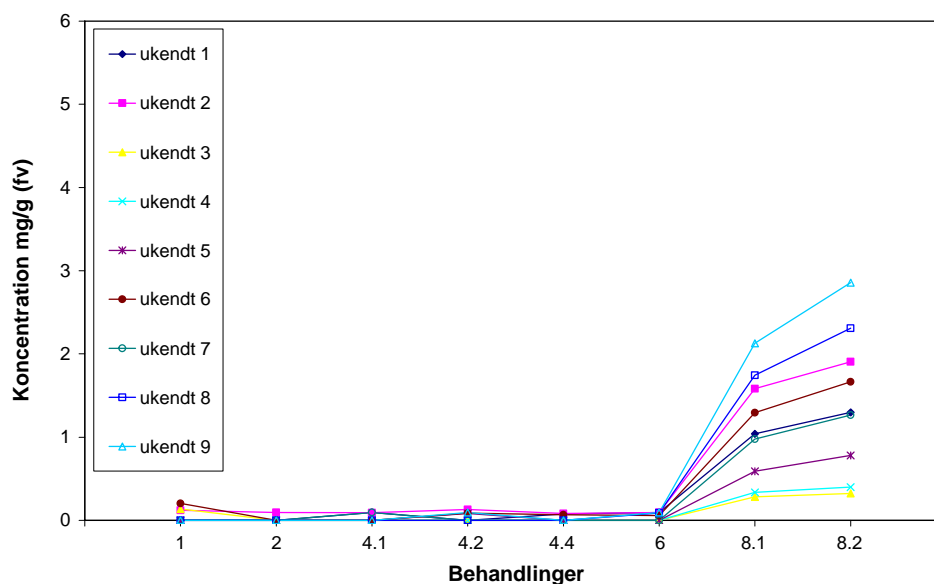
Figur 2. Typisk analytisk HPLC kromatogram af et kombineret methanol/80 % methanol ekstrakt fra en Amerikansk ginsengrod. Kromatogrammet viser fordelingen af ginsenosider 1 = Rg1; 2 = Re; 3 = Ro; 4 = m-Rb1; 5 = m-Rc; 6 = m-Rd; 7 = Rb1; 8 = Rc; 9 = Rb2; 10 = Rd og polyacetyler (11 = panaxydol; 12 = falcarinol) i ekstraktet, der blev adskilt på en Purospher STAR RP-18 kolonne (5  $\mu$ m; 250  $\times$  4 mm i.d.) ved 35  $^{\circ}$ C ved at benytte følgende gradient af solvent A (10 % acetonitril–90 % 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 5.82 [v/v]) og solvent B (75 % acetonitril–25 %  $\text{H}_2\text{O}$  [v/v]): 0 min 0 % B, 5–15 min 15 % B, 26 min 20 % B, 36 min 22 % B, 45 min 33 % B, 50 min 35 % B, 55 min 40 % B, 75 min 80 % B, 90–105 min 100 % B, 115 min 0 % B. Alle stigninger/fald i gradienten var lineær programmeret. Flow hastighed: 1 ml/min. Injektionsvolumen: 20  $\mu$ l. Detektion: Diode array detektor, der optog signaler fra 200–600 nm.

### Resultater for ginsenosider og polyacetyler



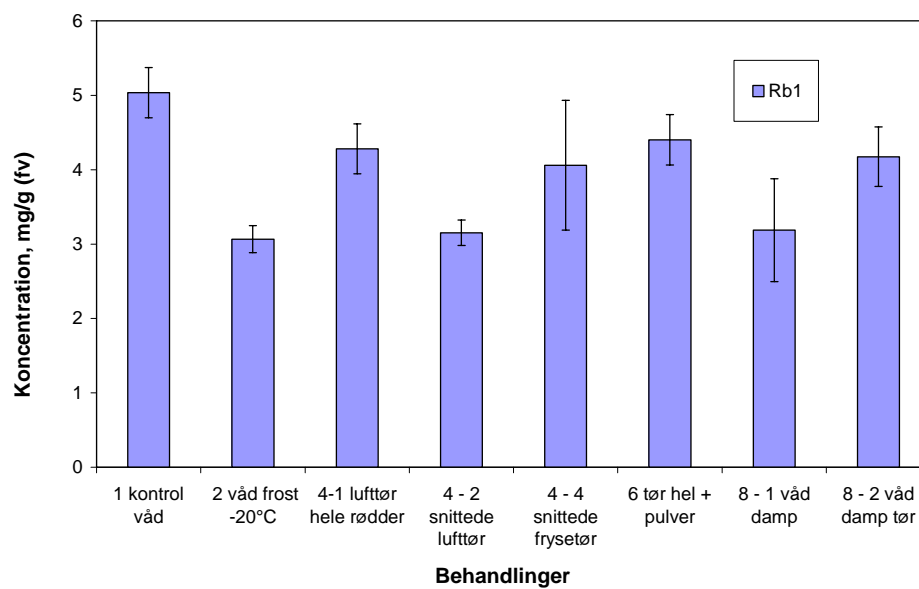
Figur 3. Ændringer i koncentrationer af identificerede enkelt ginsenosider afhængig af behandlingen af 7 år gamle amerikanske ginseng rødder. Numre på x akse henviser til de behandlinger, der er beskrevet i materialer og metoder (se evt. figur 4 akse).

Overordnet set er mange af ginsenosiderne ret konstante og ikke specielt følsomme for de fleste behandlinger (figur 3). Koncentrationen af ginsenosiderne Re, MRb1, MRd og Rg1 reduceres dog kraftigt ved dampbehandlingen. Der er en tydelig tendens til at friske utørrede rødder (behandling 1) har højere indhold af de fleste stoffer end andre behandlinger. Både hele rødder lufttørret ved 38°C i 7 dage (behandling 4.1) og hele lufttørrede og pulveriserede rødder (behandling 6) gav næsten ligeså høje koncentrationer for de fleste stoffer. Ændringerne i malonyl typerne (m- mærket) er særligt spændende da de dels oftest er ustabile og dels ikke så ofte medtages i analyser af ginsenosidindholdet.

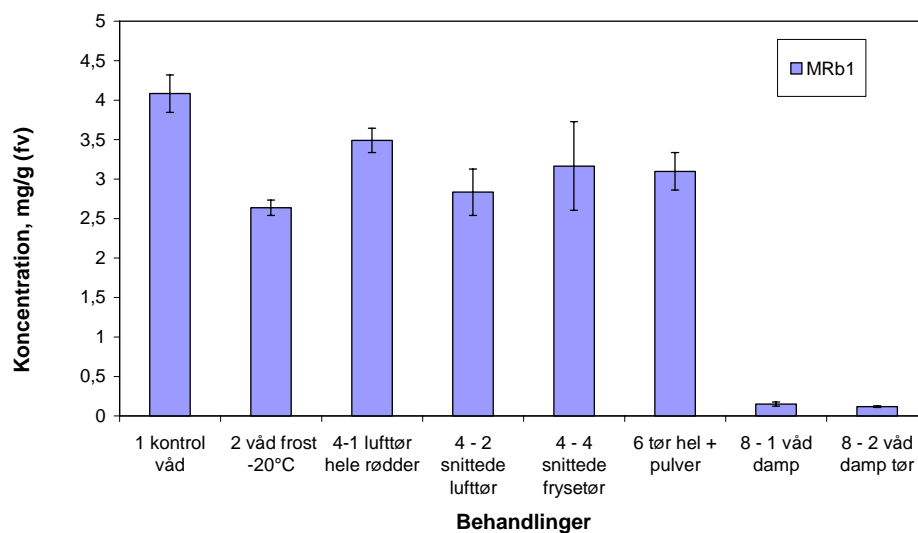


Figur 4. Ændringer i koncentrationer af ikke identificerede enkel tginsenosider afhængig af behandlingen af 7 år gamle amerikanske ginseng rødder. Numre på x akse henviser til de behandlinger, der er beskrevet i materialer og metoder (se evt. figur 5 akse).

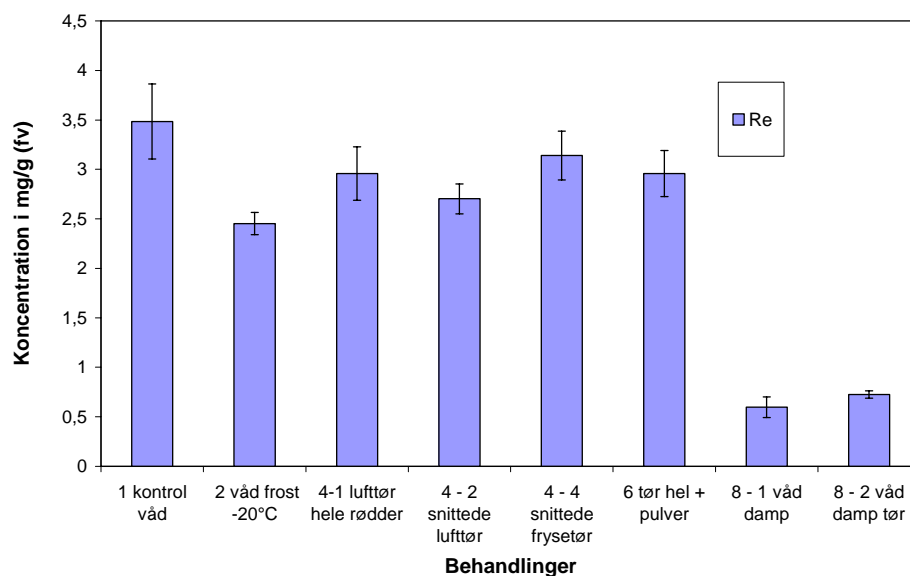
I figur 4 ses at der med dampbehandlingen (8.1 + 8.2) dannes en række nye stoffer, som dog har været målt i meget lave koncentrationer i flere af de øvrige behandlinger. Kun et stof (ukendt 4) er helt nyt og er kun fundet i dampbehandlingerne. Det er højst sandsynligt at flere af disse stoffer er ginsenosider og delvise nedbrydningsrester af ginsenosider. Flere nye ginsenosider er bl.a. karakteriseret i koreansk ginseng efter dampbehandling.



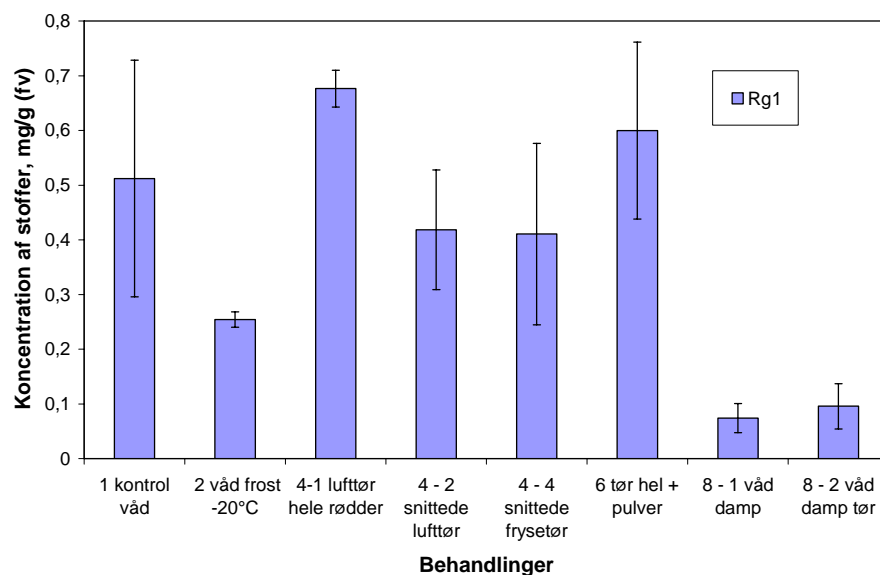
Figur 5. Ændringer i koncentration af ginsenosidet Rb1 afhængig af behandlinger af ginsengrødderne.



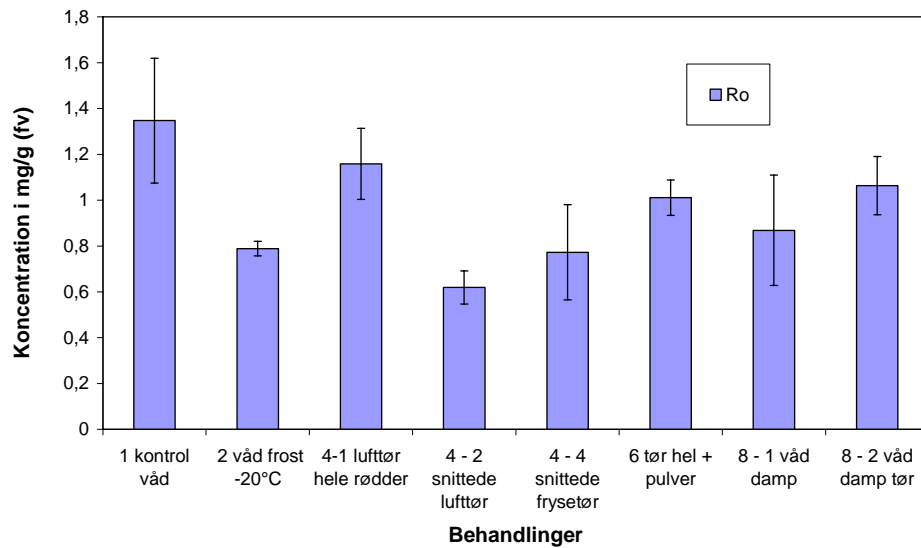
Figur 6. Ændringer i ginsenosidet malonyl Rb1 afhængig af behandlinger af ginsengrødder. Bemærk den kraftige reduktion i koncentrationen efter dampbehandling, der er karakteristisk for flere malonylerede ginsenosider.



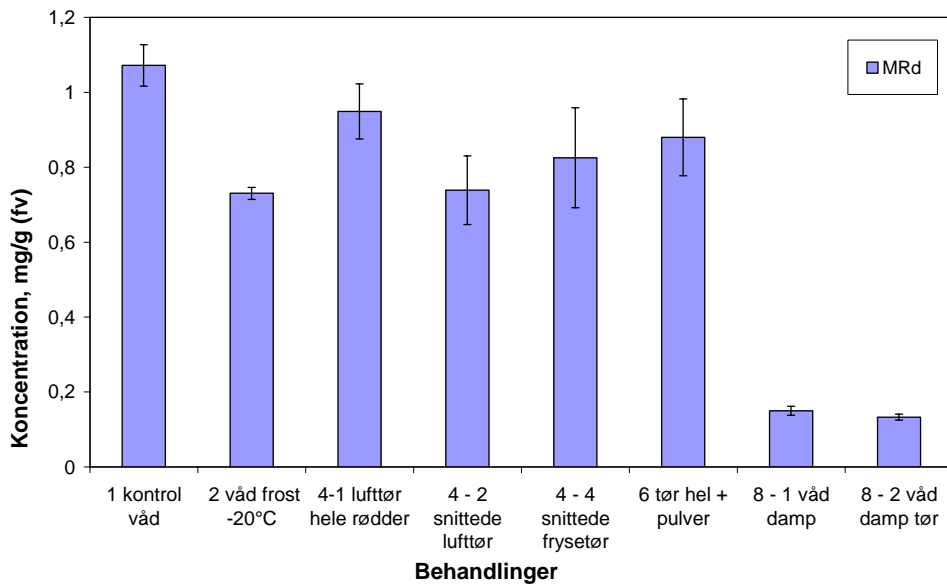
Figur 7. Ændringer i det meget almindelige ginsenosid Re afhængig af behandlingerne af ginsengrødder. Re er her fundet at være meget følsom for varmebehandling. At rød dampet ginseng vurderes stærkere end hvid ginseng, kan altså ikke være relateret til koncentrationen af Re, men må afhænge af andre stoffer.



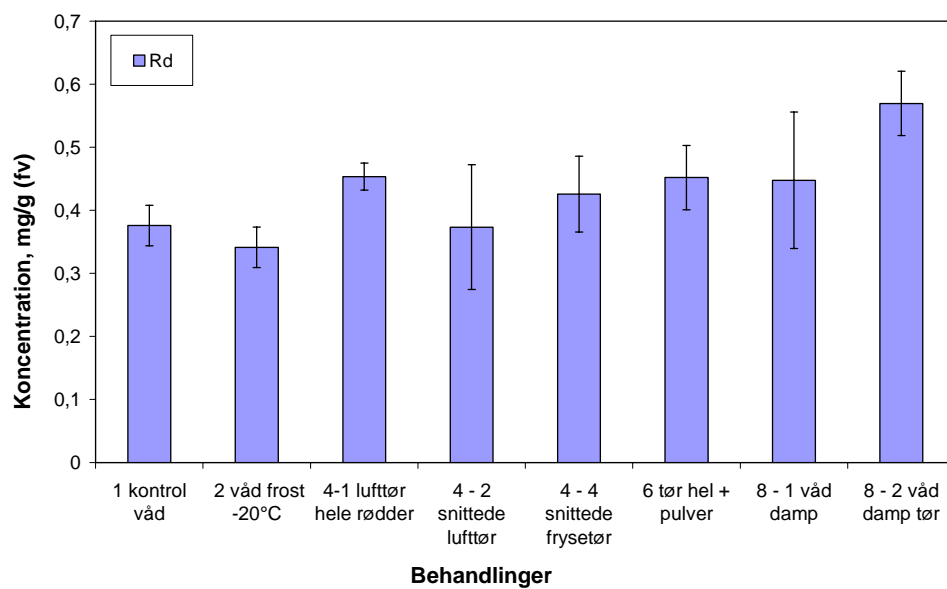
Figur 8. Ændringer i det meget almindelige ginsenosid Rg1 afhængig af behandlingerne af ginsengrødder. Rg1 er her fundet også at være meget følsom for varmebehandling



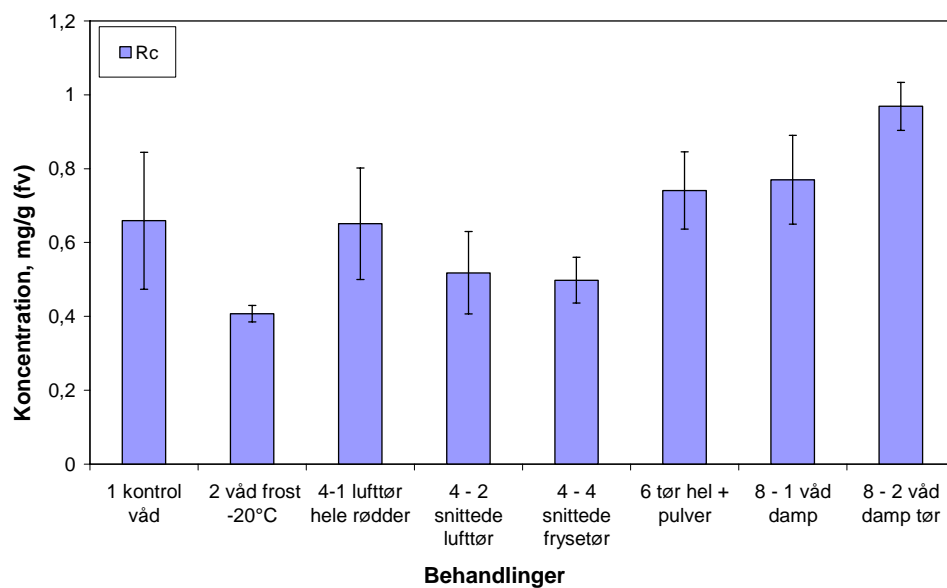
Figur 9. Ændringer i ginsenosidet Ro afhængig af behandlingerne af ginsengrødder. Ro ser ud til at være ret stabilt og tåler også dampbehandling uden reduktion i koncentrationen.



Figur 10. Ændringer i ginsenosidet M-Rd afhængig af behandlingerne af ginsengrødder.

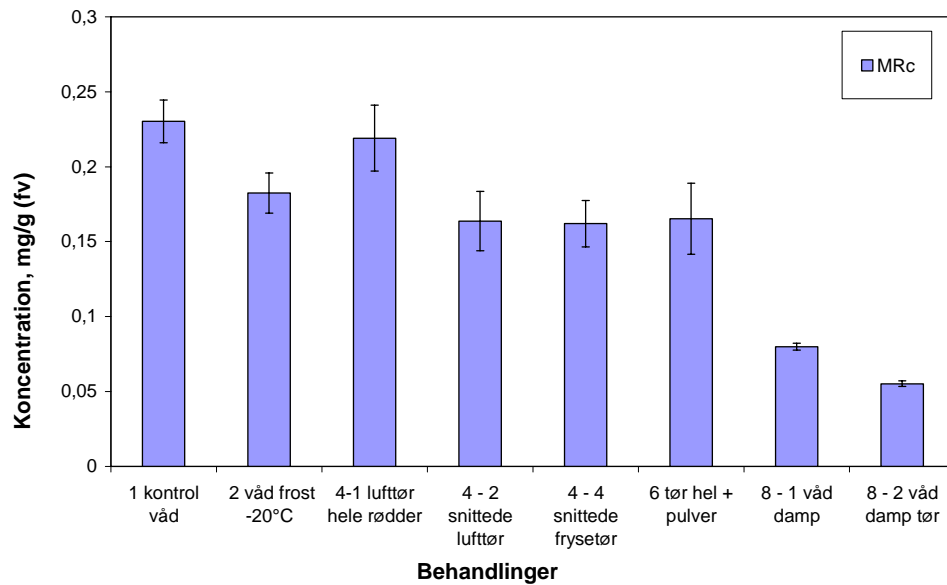


Figur 11. Ændringer i ginsenosidet Rd afhængig af behandlingerne af ginsengrødder

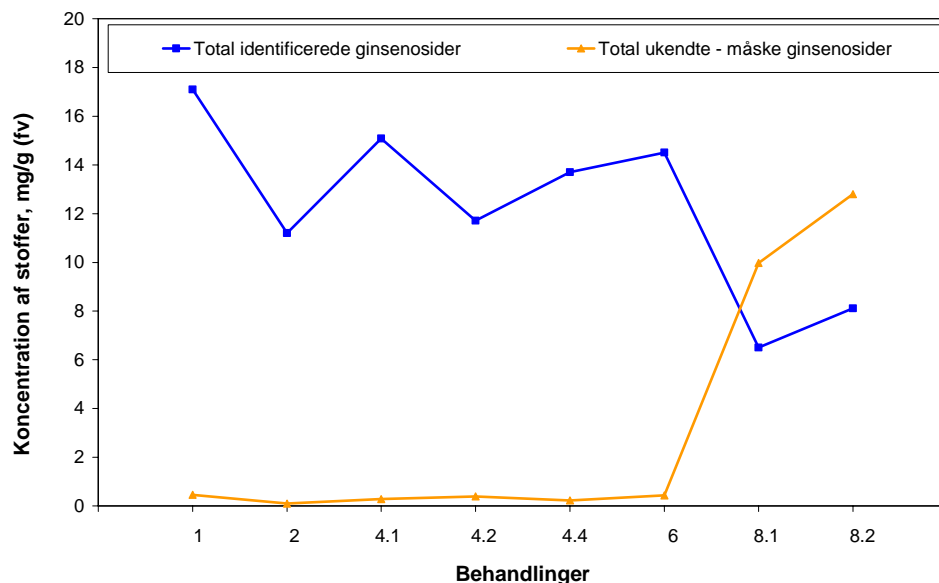


Figur 12. Ændringer i ginsenosidet Rc afhængig af behandlingerne af ginsengrødder





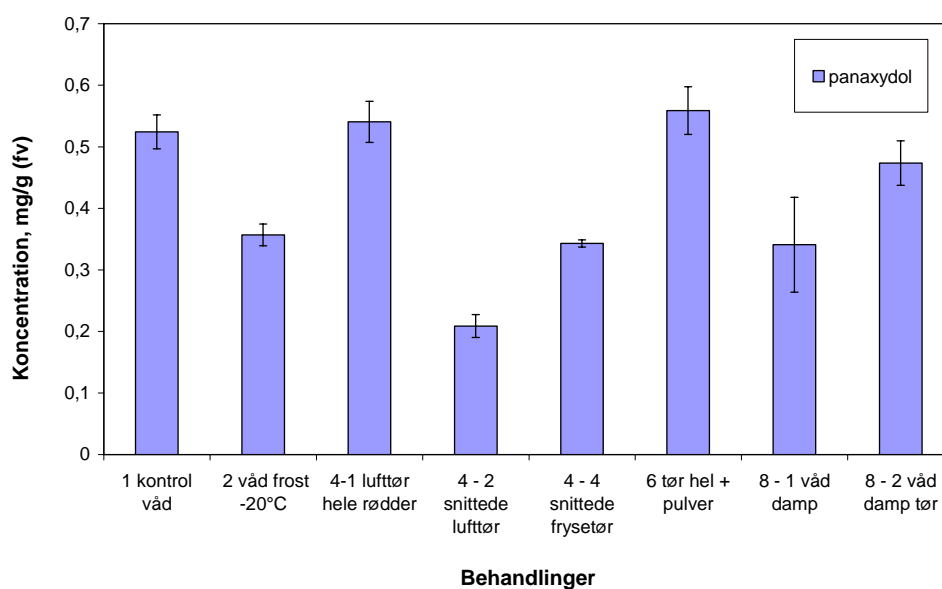
Figur 13. Ændringer i ginsenosidet M-Rc afhængig af behandlingerne af ginsengrødder. Faldet i MRC efter dampning passer med en stigning i Rc i figur 11.



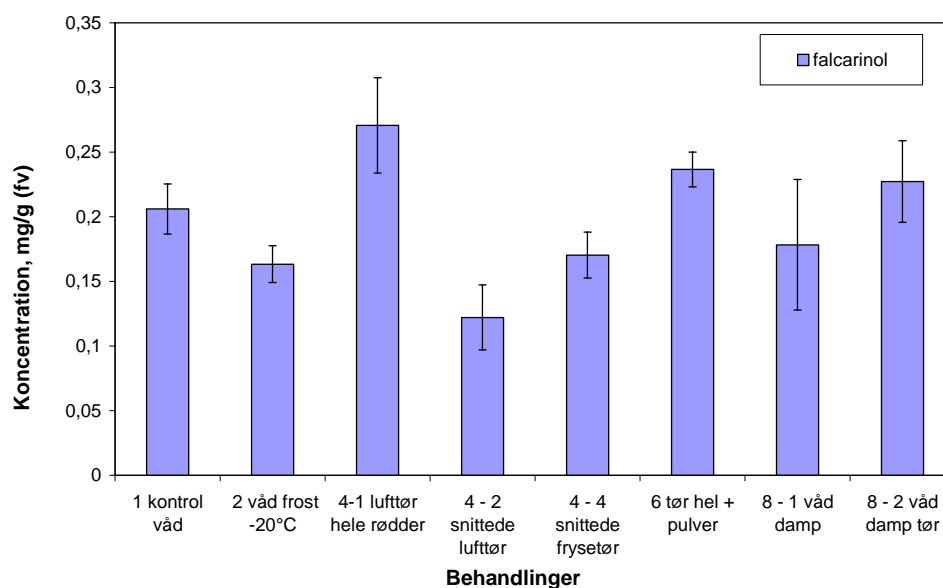
Figur 14. Ændringer i totalindholdet af identificerede ginsenosider og uidentificerede stoffer, hvoraf mange formodes at være ginsenosider, afhængig af behandlingerne af ginsengrødder.

Det samlede resultat for ginsenosider indikerer at behandling 2 (frysning af friske rødder) og behandling 4.2 (snitning af friske rødder før tørring) giver lavere koncentrationer end behandling 1, 4.1, 4.4 og 6. Behandling 2 og 4.2 er begge vævsdestruktive og åbner for øget enzymatisk og oxidativ nedbrydning af ginsenosider. Den friske utørrede rod har totalt det

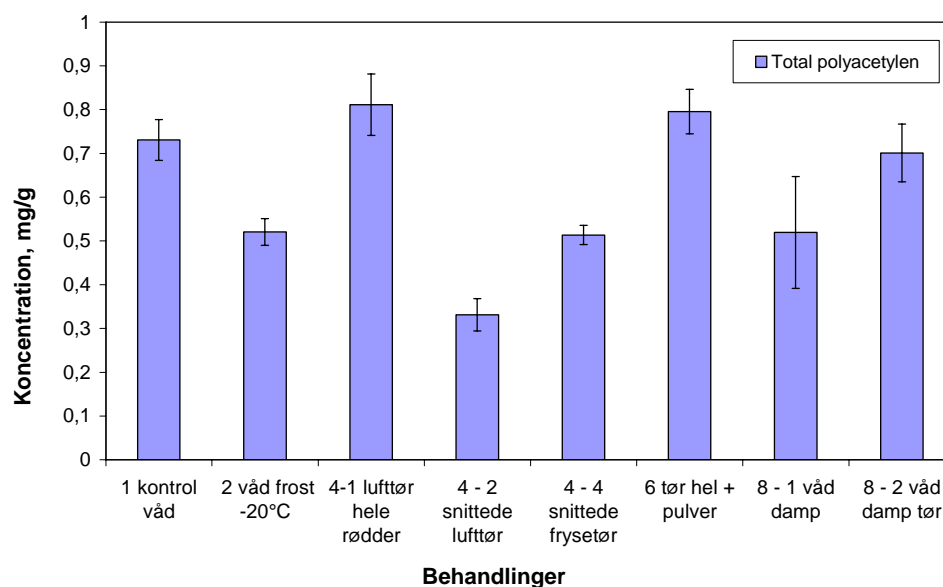
højeste indhold af ginsenosider, fulgt af hele rødder tørret ved 38°C i 7 dage (beh. 4.2) og behandling 6 (formalet lufttørret rod). De snittede og frysetørrede rødder (beh. 4) ligger lige under dette niveau, men de fleste af disse mindre forskelle er ikke signifikant forskellige. Dampning af rødder ændrer koncentrationen af nogle stoffer dramatisk så total koncentrationen af kendte ginsenosider ender på næsten en tredjedel af det der er i friske rødder. Ikke alle enkeltginsenosider er dog lige følsomme for dampbehandling. Hvis der primært er tale om en konvertering af nogle ginsenosider til nogle andre og total mængden af ginsenosider er ca. konstant, skal summen af kendte og ukendte være næsten konstant. Dette gælder for behandling 8.1 mens behandling 8.2 totalt giver et lidt øget indhold. Der skal dog tages forbehold for evt. usikkerhed fra korrektionen for vandindhold og de indbyggede usikkerheder der er i analysemetoderne, hvorfor dette kun er spekulationer indtil de ukendte stoffer er identificeret.



Figur 15. Ændringer i indholdet af polyacetylenet panaxydol afhængig af behandlinger.



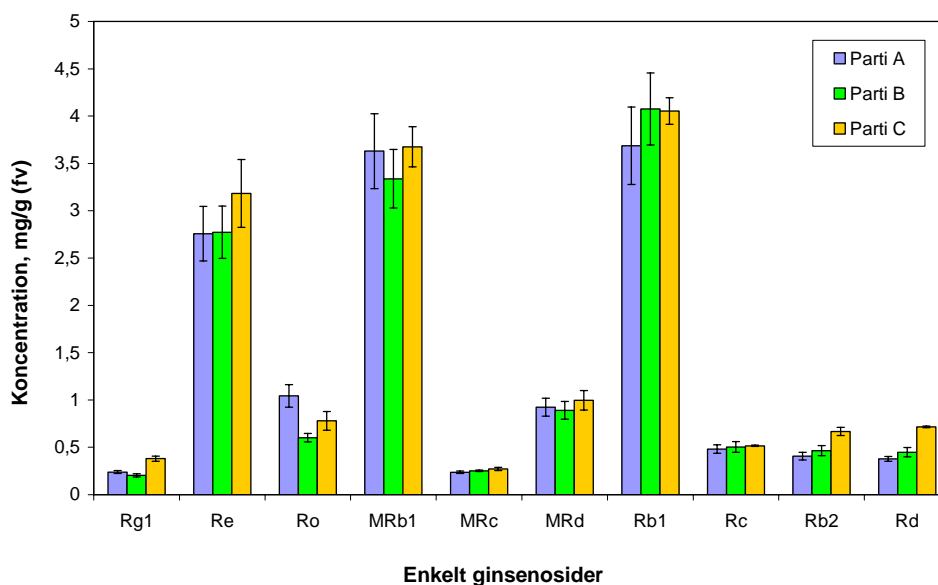
Figur 16. Ændringer i indholdet af polyacetylenet falcarinol afhængig af behandlinger af rødder.



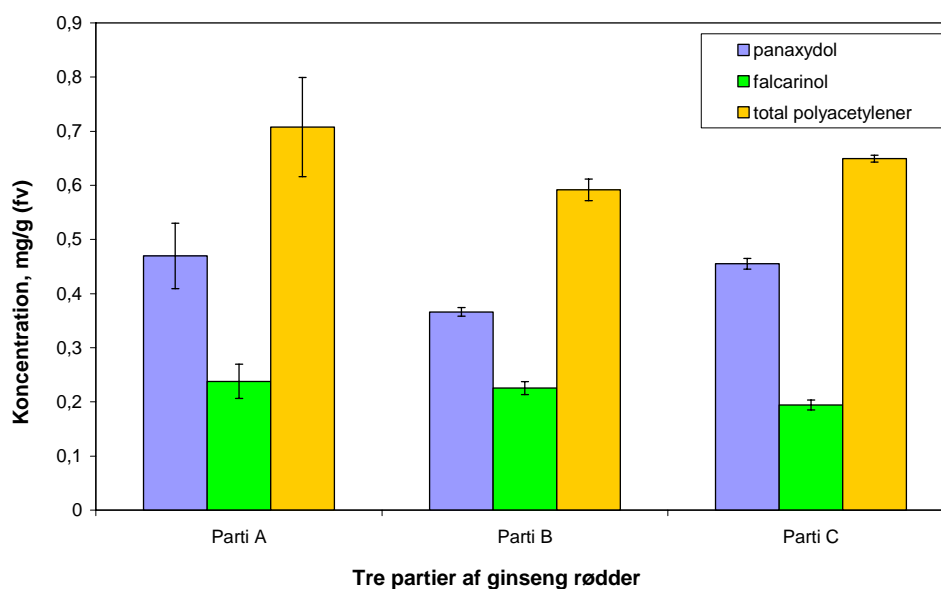
Figur 17. Ændringer i totalindholdet af polyacetylen afhængig af behandlinger af rødder

Reaktionsmønstret for de to polyacetylen er meget ens og man kan derfor se på totalen for en vurdering af følsomhed. Resultatet minder meget om resultatet for ginsenosider idet behandling 1, 4.1 og 6 igen giver de højeste indhold af polyacetylen, her dog skarpt forfulgt af og ikke signifikant forskellig fra dampbehandlet og tørret rod (beh. 8.2). De øvrige behandlinger (2, 4.2, 4.4 og 8.1) giver alle plads for reduktioner via enzymatisk eller oxidativ nedbrydning og ændring og giver her lavere indhold af bioaktive stoffer. Polyacetylen er dog tilsyneladende ikke så følsomme overfor dampbehandlinger som mange ginsenosider.

## Firmaprøver fra Kongshave Ginseng



Figur 18. Indhold af enkelt ginsenosider i 3 partier af amerikanske ginseng rødder fra Kongshave Ginseng.



Figur 19. Indhold af polyacetylenes i 3 partier af amerikanske ginseng rødder fra Kongshave Ginseng

Både ginsenosid profilen og polyacetylenprofilen for de tre partier fra Kongshave Ginseng er ret ens og ligger op ad indholdet i prøverne fra DJF Årsløvs forsøgsplantage. Kun få ginsenosider findes i signifikant forskellige koncentrationer i de tre partier og det er hyppigst parti 3, der skiller sig ud med lidt højere værdier på nogle af de 'små' ginsenosider. Total polyacetylen koncentrationen var ikke signifikant forskellig i de tre partier. Resultatet har givet avleren et bredt indblik i koncentrationen af bioaktiverstoffer og et vist indblik i variationen i sit plantemateriale.

Tørringsforsøg fra diplomstudiet

For at integrere tørringsforsøget fra Trine Nordqvists specialeprojekt bedst muligt i den faglige sammenhæng i rapporten er det valgt at inkludere den midt i rapporten sammen med øvrige data på ginsenosider og polyacetylen. Bidraget er en kopi af udkast til artikel til Projektavis 4 ved Udviklingscenter Årsløv.

Ginseng rødder – valg af tørringsmetode har ikke stor betydning for indholdet af bioaktive stoffer  
Af Trine Nordqvist, Specialestuderende, Lars Porskjær Christensen, Adjungeret Professor, og Ulla Kidmose, Seniorforsker, Afdeling for Råvarekvalitet, Danmarks JordbrugsForskning, Forskningscenter Årsløv

**Manchet:** Tørring af ginseng rødder er en udbredt metode i forbindelse med produktion af ginsengpræparater. En ny undersøgelse viser, at valg af tørringsmetode i forbindelse med tørring af ginseng rødder ikke umiddelbart har den store betydning på indholdet af bioaktive stoffer.

### **Forarbejdning**

Der findes to overordnede metoder til forarbejdning af ginseng, hvor den ene resulterer i hvid ginseng og den anden i rød ginseng. Den hvide ginseng består af lufttørrede rødder, mens den røde ginseng er dampet ginseng, der efterfølgende lufttørres. Under dampnings-processen karamelliseres sukkerforbindelserne i roden og roden skifter derved farve fra lys gullig hvid til mørk rød, heraf navnet rød ginseng. Ved forarbejdning af ginseng til rød ginseng sker der ligeledes en omdannelse af bl.a. bioaktive ginsenosider til andre endnu mere aktive ginsenosider hvorfor rød ginseng oftest betragtes mere værdifuld i Asien end hvid ginseng.

Forarbejdningen af ginseng til tørret hvid ginseng er dog den mest udbredte forarbejdningsform og de fleste ginsengpræparater er da også baseret på denne type ginseng. Forarbejdning af ginseng til hvid ginseng kan overordnet deles op i følgende delprocesser; høst, vask, tørring, opbevaring og videre produktforarbejdning. Forarbejdningen af tørret ginseng starter ved at ginsengplanterne høstes i efteråret når planterne er over 4 år, idet størrelsen og koncentrationen af aktivstoffer i ginsengroden efter 4 år har nået et passende niveau. Inden tørringen vaskes rødderne forsigtigt for at fjerne overskydende jord og efter vask kan rødderne opbevares friske i 4-6 uger uden der sker en forringelse i kvaliteten, herunder indhold af aktivstoffer.

Tørringen foregår oftest vha. forceret varm luft, der har afløst den traditionelle tørring i solen. Herved opnås en kortere tørringstid og tørringen kan bedre kontrolleres. Lufttørringen foregår ved at rødderne spredtes ud i et enkelt lag på hylder af gitter eller trådnæt, der herefter placeres i et godt ventileret, opvarmet rum, skur eller skab. Der er ikke enighed om den optimale tørringstemperatur i litteraturen, men der foreslås temperaturer mellem 16 °C til 45 °C og at temperaturen løbende kan ændres i tørringsprocessen. I dyrkningsvejledningerne tilrådes det dog at anvende en tørringstemperatur på 38°C og ikke at overstige en temperatur på 40 °C, da der ved højere temperaturer sker en brunning/karamelisering af rødderne. For at en tørret ginsengrod er af en god kvalitet, skal overfladen have en lys gullig hvid farve mens roden indvendig skal være hvid. Afhængig af tørringsudstyret og røddernes diameter varer tørringsprocessen typisk 2-4 uger. Tørringen stoppes når rødderne når et gennemsnitligt vandindhold på 10 % (vådvægt). Ved kommerciel tørring kan det vurderes om rødderne er passende tørre ved at brække en rod over. Sker dette med et ren brud og med et "knæk" er vandindholdet i roden under de anbefalede 10 % (vådvægt).

### ***Tørringsforsøg***

Tørring af ginseng er et af de trin i forarbejdningsprocessen som kan have betydning på indhold af bioaktive stoffer i hvid ginseng og produkter heraf. Lufttørring er den tørringsmetode, der har været mest undersøgt og dette skyldes sandsynligvis at metoden anvendes i kommerciel produktion. Fra tidligere tørringsforsøg af hele ginseng rødder er der noget der tyder på at koncentrationen af enkelte ginsenosider falder ved lufttørring selvom resultaterne ikke er helt entydige. Tørringens betydning på indhold af polyacetylen har ikke været undersøgt så det er stadig uvist om hvorledes f.eks. lufttørring påvirker koncentrationen af disse bioaktive stoffer. Indholdet af bioaktive stoffer i ginseng kan variere meget selv i populationer af rødder, der er dyrket under ens betingelser. Derfor kan det ofte være svært at vurdere f.eks. tørringens betydning på indholdet af bioaktive stoffer i hele rødder da det er svært at lave repræsentative prøver, hvor udgangspunktet i en referenceprøve (ofte frysetørret prøve) og prøver lufttørret ved forskellige temperaturer er ens således at en sammenligning er mulig.

For at tage højde for variationen i plantematerialet for bedre at kunne vurdere tørringens betydning på indholdet af bioaktive stoffer blev 6-årige rødder skåret i større stykker på 3-4 g og blandet randomiseret. Fra denne samlet pulje af rodstykker blev udtaget prøver til de forskellige tørringsforsøg for at opnå så ensartede prøver som muligt. Herefter blev de respektive udtagne prøver lufttørret ved henholdsvis 30, 38 og 55 °C samt frysetørret. Som reference blev friske stykker af ginseng rødder anvendt.

Lufttørningstiden ved henholdsvis 30, 38 og 55 °C er vist i **Figur 20** og som ventet var tørretiden kortere ved højere temperaturer. Der er enighed i litteraturen om at tørning ved høje temperaturer gør rødderne uønsket mørke og denne tendens blev også visuelt konstateret i dette forsøg, hvor rødder tørret ved 55 °C var tydeligt mørkere end rødder tørret ved 30 og 38 °C (**Figur 21**). Desuden var alle de lufttørrede rødder mørkere end de friske og frysetørrede rødder (**Figur 21**). Desuden blev det konstateret at jo højere tørningstemperatur, der blev anvendt, jo hårdere og mere indskrumpede og forvredne var rødderne også.

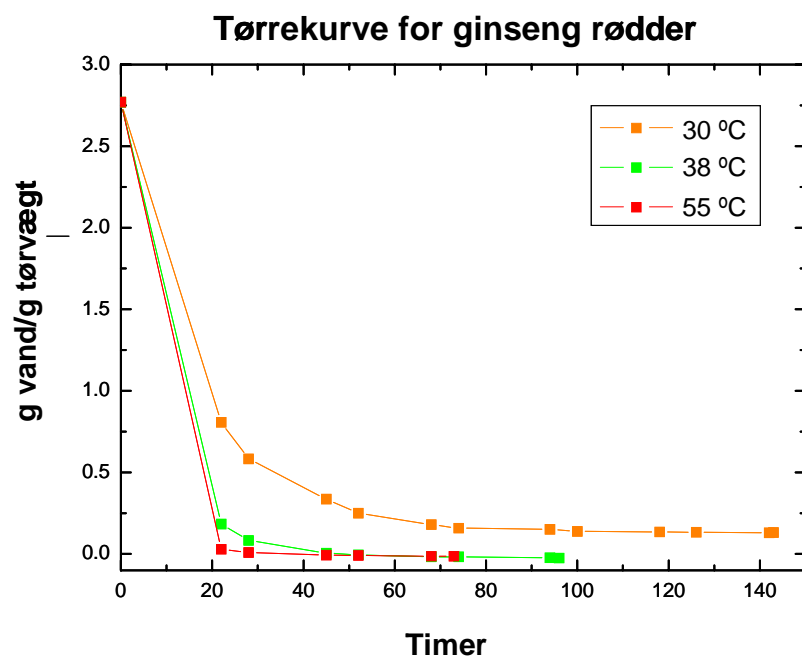
#### ***Effekt af tørning på indhold af bioaktive stoffer***

Resultaterne fra de kemiske analyser af de tørrede prøver inkl. den friske referenceprøve for bioaktive ginsenosider og polyacetylenere viste for det første at der var stor variation indenfor de udtagne prøver. Denne variation fremgår af de store variationskoefficienter angivet i **Tabel 3** for de respektive prøver. Så på trods af bestræbelserne på at få lavet rimelig ensartede prøver så viser resultaterne med al tydelighed at dette ikke lykkes fuldt ud og at det er svært at lave ensartede prøver med mindre man finder rødderne helt. Dette er til gengæld ikke sammenlignelig med tørning af hele rødder og desuden vil en sådan findeling sandsynligvis resultere i andre nedbrydningsprocesser af de bioaktive stoffer så som oxidation og enzymatisk nedbrydning. For det andet viser resultaterne fra de kemiske analyser at indholdet er på samme niveau uanset ved hvilken temperatur man har tørret rødderne. De forskelle der umiddelbart måtte være er ikke signifikant forskellige og hvis der er nogen effekt på indholdet af bioaktive stoffer mellem prøverne tørret ved de forskellige temperaturer så skjules de under den store variation. Så den umiddelbare konklusion er at valg af tørringsmetode af ginseng rødder ikke har den store betydning for indholdet af bioaktive stoffer.

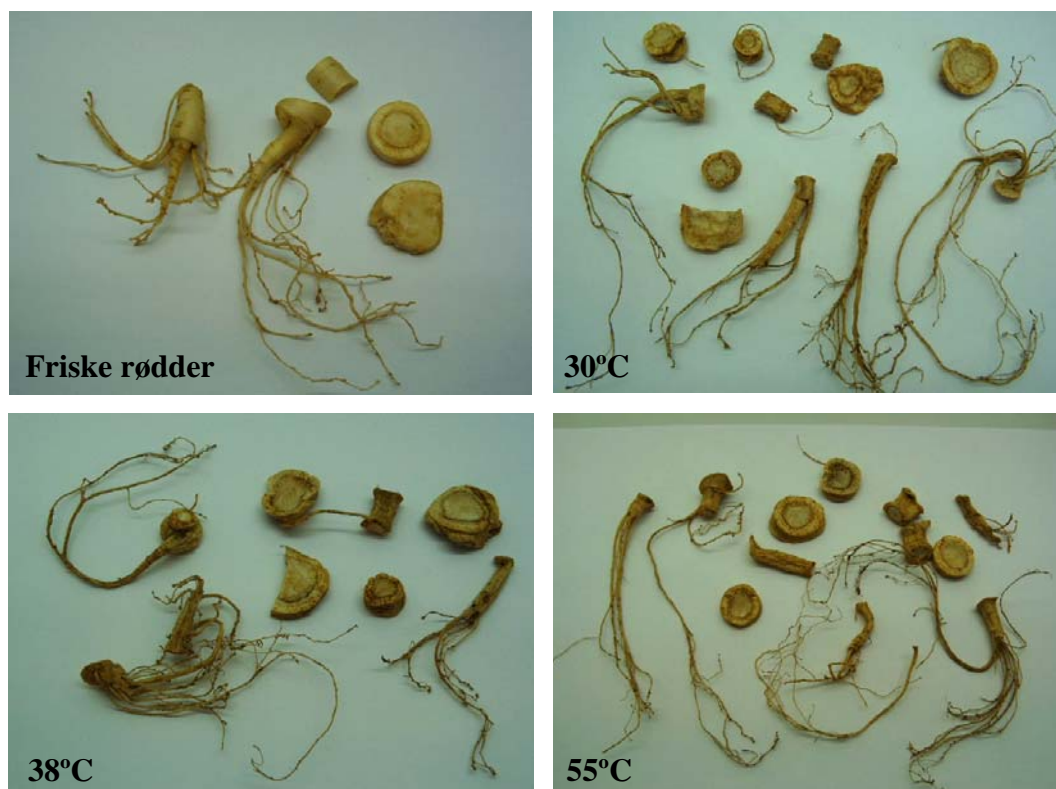
**Tabel 3.** Betydning af lufttørring af ginseng rødder ved forskellige temperaturer, inkl. frysetørring på indholdet af ginsenosider og polyacetylenere. Tallene i parentes angiver variationskoefficienten i %. Der blev ikke fundet signifikante forskelle mellem de enkelte behandlinger ( $P > 0,05$ ).

	Indhold af bioaktive stoffer i mg/g frisk rod ved forskellige temperaturer				
	Reference	30 °C	38 °C	55 °C	Frysetørring
R <sub>g1</sub>	0,47 (34)	0,31 (38)	0,57 (58)	0,42 (58)	0,34 (38)
R <sub>e</sub>	3,03 (44)	2,40 (46)	3,11 (33)	2,90 (33)	1,90 (58)
R <sub>o</sub>	0,93 (36)	0,89 (57)	0,99 (24)	0,95 (33)	0,58 (40)
mR <sub>b1</sub>	3,22 (28)	2,72 (40)	3,11 (37)	2,93 (35)	2,49 (44)
mR <sub>c</sub>	0,23 (26)	0,21 (27)	0,26 (42)	0,20 (25)	0,20 (29)
mR <sub>d</sub>	0,87 (32)	0,73 (41)	0,94 (35)	0,80 (37)	0,64 (44)
R <sub>b1</sub>	3,96 (30)	3,70 (39)	4,14 (32)	3,74 (34)	3,37 (43)
R <sub>c</sub>	0,46 (31)	0,49 (41)	0,65 (42)	0,60 (50)	0,41 (42)
R <sub>b2</sub>	0,44 (41)	0,39 (41)	0,50 (39)	0,39 (26)	0,36 (55)
R <sub>d</sub>	0,39 (33)	0,43 (36)	0,46 (39)	0,42 (31)	0,42 (49)
Panaxydol	0,45 (28)	0,43 (41)	0,60 (39)	0,61 (88)	0,41 (49)
Falcarinol	0,20 (27)	0,18 (41)	0,24 (45)	0,29 (100)	0,16 (49)
Total ginsenosider	13,99	12,27	14,73	13,34	10,72
Total polyacetylenere	0,66	0,61	0,84	0,89	0,57





Figur 20. Tørrekurver for lufttørrede ginsengrod stykker. Orange: rodstykker tørret ved 30°C, Grøn: rodstykker tørret ved 38°C, Rød: rodstykker tørret ved 55°C).



Figur 21. Billeder af ginsengrødder efter tørring. Venstre øverst: friske rødder, højre øverst: rødder tørret ved 30°C, venstre nederst: rødder tørret ved 38°C og højre nederst: rødder tørret ved 55°C.

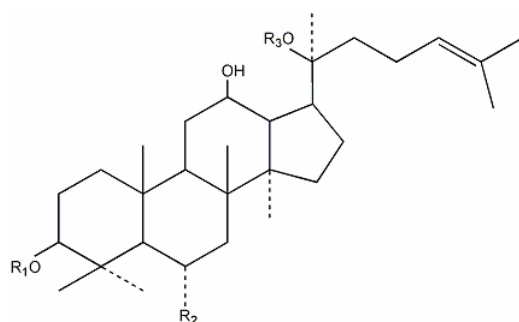
# Polysakkarider og ginsenosider med sukkergrupper

Electrospray MS identifikation af aktive komponenter i vandige ginsengekstrakter.

## Prøveforberedelse

De vandige brun-gule ekstrakter blev indledningsvis filtreret gennem et centrifugefilter (Microcon YM-100) med et cut-off på 100.000 NMW ved 14000g i 15 min for at fjerne eventuelle partikulære urenheder og efterfølgende fortyndet 1:10 med 30 % acetonitril. Acetonitril blev tilsat for at nedsætte overfladespændingen og derved sikre en mere stabil electrospray.

Standarder af ginsenosider Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, og Rg1 blev opløst i mindst muligt 30 % acetonitril. Grundstrukturen, monoisotopisk (mw) vægt og forventede MS ioner af de udvalgte ginsenosider er præsenteret i figur 22



Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	MW	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
Rb <sub>1</sub>	Glc- <sup>2</sup> Glc-	H	Glc- <sup>6</sup> Glc-	1108,6	1109,6	1131,6	1147,6
Rb <sub>2</sub>	Glc- <sup>2</sup> Glc-	H	Ara(p)- <sup>2</sup> Glc-	1078,6	1079,6	1101,6	1117,6
Rc	Glc- <sup>2</sup> Glc-	H	Ara(f)- <sup>2</sup> Glc-	1078,6	1079,6	1101,6	1117,6
Rd	Glc- <sup>2</sup> Glc-	H	Glc-	946,6	947,6	969,5	985,5
Re	H	Rha- <sup>2</sup> Glc-O-	Glc-	946,6	947,6	969,5	985,5
Rg <sub>1</sub>	H	Glc-O-	Glc-	800,5	801,6	823,5	839,5

**Figur 22.** Kemisk struktur, monoisotopisk molekylvægt (MW) samt forventede MS ioner af udvalgte ginsenosider. Forkortelser: Glc, glukose; Ara(p), arabinose i pyranose form; Ara(f), arabinose i furanose form; Rha, rhamnose.

Desuden forventes der en del ioner fra sakkarider enten i form af fragmenter fra ginsenosider eller som naturlige bestanddele i ginsengrødderne. Forventede MS ioner af hyppige sakkarider i ginseng ekstrakter er beskrevet i Tabel 4 (baseret på Miao et al, 2002).

## Metode

Massespektrometrisk analyse blev foretaget på en Agilent XCT-Ultra Ionfælde udstyret men en Agilent elektropray ionkilde (ESI). Prøverne blev analyseret ved direkte infusion i ESI-kilden fra en sprøjtepumpe ved et flow på 5 µl/min. Massespektre blev optaget med positiv ionisering ved scanning over masseområdet m/z 100-2200. Spændingen over nålen blev holdt konstant på 3500V med et dry-gas flow på 7 l N<sub>2</sub>/min ved 325°C og nebulizer gas flow på 20 l N<sub>2</sub>/min. MS<sup>2</sup> og MS<sup>3</sup> eksperimenter blev foretaget ved kollisions induceret fragmentation (CID) i ionfælden af de i MS spektret dominerende masser.

For at øge følsomheden og derved opnå bedre indsigt i de mindre intensive ioner blev prøverne ligeledes analyseret med en Agilent nano-elektropray ionkilde (nano-ESI). Kilden var fittet med en 20/10 µm (id/spids) elektropraynål fra New Objective. Prøverne blev fortyndet til 1:1000 med 30 % acetonitril før analyse på nano-ESI kilden. Infusionsflowet blev sat til 100 nl/min og spændingen over nålen blev holdt konstant på 2200V med et drygas flow på 6 l N<sub>2</sub>/min ved 200°C.

**Tabel 4** Kendte fragmenter af ginsenosid sakkarider.

Sakkarider	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
Rha+ H-H <sub>2</sub> O	147,1		
Glc +H-H <sub>2</sub> O	163,1		
Rha + M		187,1	203,0
Glc + M		203,1	219,0
GlcAra+H-H <sub>2</sub> O	295,1		
GlcRha+H-H <sub>2</sub> O	309,1		
GlcAra(p)+H	313,1		
GlcGlc+H-H <sub>2</sub> O	325,1		
GlcRha+H	327,1		
GlcAra(p)+M		335,1	351,1
GlcGlc+H	343,1		
GlcRha+M		349,1	365,1
GlcGlc+M		365,1	381,1
GlcGlcGlc+M		527,2	543,1

Forkortelser er identisk med figur 23, M angiver alkalimetallion hhv. kalium og natrium.

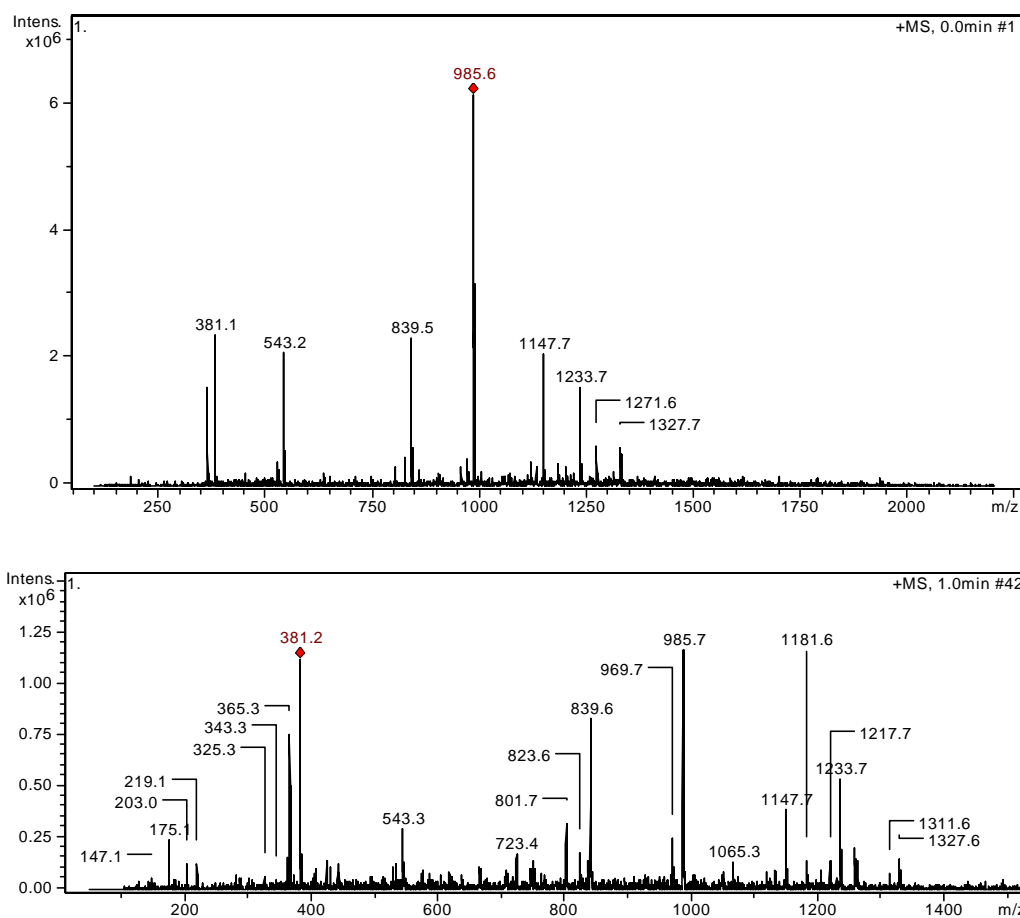
## Resultater

### Råprøver

ESI/MS spektret af det vandige rækstrakt af rødder før behandling indeholder udelukkende enkeltladede ioner fra ginsenosider, små mono-, og oligosakkarider samt nogle ukendte forbindelser som kan være afledt af ginsenosider, figur 23. De dominerende ginsenosider identificeres som kalium addukter af Rb1 ved m/z 1147,7, Re eller Rd ved m/z 985,6, Rg1 ved m/z 839,5 samt malonyl konjugeret Rb<sub>1</sub> [mRb1 +K]<sup>+</sup> ved m/z 1233,7. Ginsenosider

optræder ofte som kationiserede ioner af enten kalium eller natrium,  $[M + K]^+$  eller  $[M + Na]^+$  hvorimod den protoniserede molekylar ion  $[M + H]^+$  er mindre dominerende. Figur 24 viser et udsnit af Figur 23 hvor alle tre ioner af ginsenosidet Rg1 observeres. Differentiering mellem Re og Rd kunne ikke foretages ved MS/MS studier af standarder, da begge stoffer under de angivne analytiske betingelser giver identiske fragmentations mønstre. Di- og tri sakkarider, primært glukose derivater, ses som intensive ioner ved  $m/z$  381.1  $[GlcGlc + K]^+$  og  $m/z$  543.1  $[GlcGlcGlc + K]^+$  (se tabel 4).

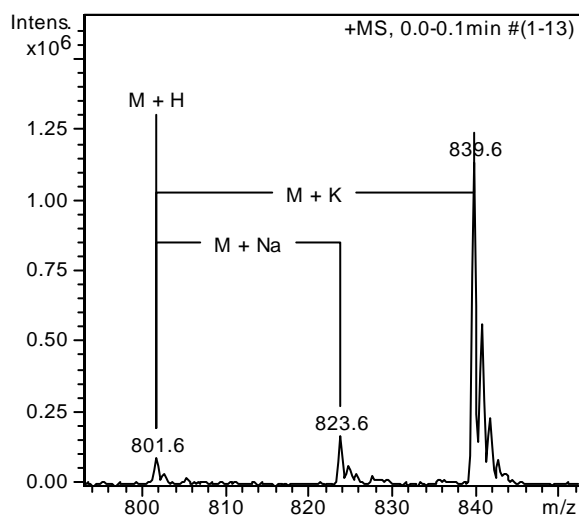
I nano-ESI spektret (figur 23, bund) ses der foruden Na og K addukter af ginsenosider en del mindre intensive ioner i området  $m/z$  175-381 som alle kan tilordnes mono- og di-sakkariderne præsenteret i tabel 4.  $M/z$  147,1 er  $[Rha + H - H_2O]^+$ ,  $m/z$  203 er  $[Rha + K]^+$  eller  $[Glc + Na]^+$ ,  $m/z$  219,1 er  $[Glc + K]^+$ ,  $m/z$  325,3 er  $[GlcGlc + H - H_2O]^+$ ,  $m/z$  343,3 er  $[GlcGlc + H]^+$ ,  $m/z$  365,3 er  $[GlcGlc + Na]^+$  eller  $[GlcRha + K]^+$ , og  $m/z$  381,2 er  $[GlcGlc + K]^+$ .



Figur 23 Top: ESI MS spektrum af vandigt ekstrakt af ginseng før lagring. Bund: Nano-ESI spektrum af den samme prøve fortyndet 1:1000

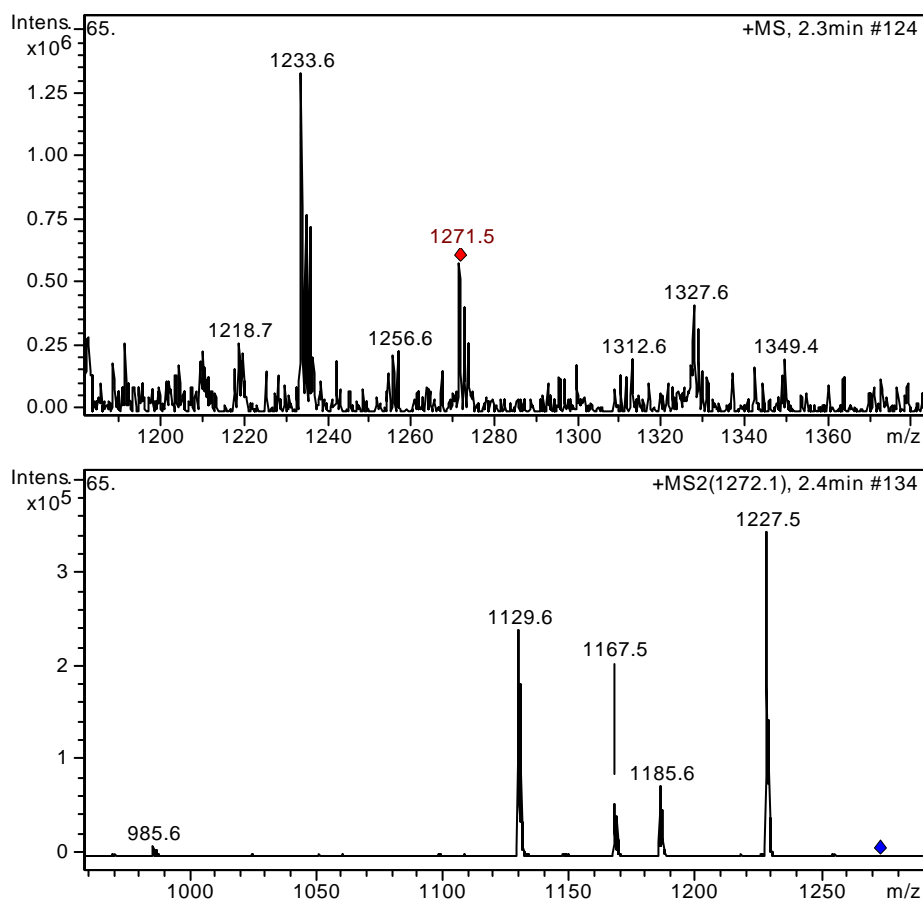
Som beskrevet af Ji et al, (2001) observeres der desuden gasfase polymisering af glucose disakkeridet ved  $m/z$  723,4  $[(\text{GlcGlc})_2 + \text{K}]^+$  og  $m/z$  1065,3  $[(\text{GlcGlc})_3 + \text{K}]^+$ . Dannelse af gasfase polymere skyldes at polysakkariderne er meget svære at overføre til gasfase samt at de kun har ringe ioniserbarhed i electrospray. Polysakkarider analyseres og kvantificeres traditionelt ved indledende destruktion til mindre enheder, oligo- eller monosakkarider, efterfulgt af anden detektion end electrospray såsom ledningsevne og GC/MS. Der observeres ikke sakkarider med masser større end  $m/z$  543.

Ud over ginsenosider og sakkarider ses der to mindre intensive ioner ved  $m/z$  1271,5 og 1327,7. Isolering af  $m/z$  1271,5 i ionfælden med efterfølgende CID gav et  $\text{MS}^2$  spektrum indeholdende 5 fragmentationer på hhv  $m/z$  1227,5, 1185,6, 1167,5, 1129,6 og 985,6, figur 25.  $M/z$  985,6 er kalium adduktet af ginsenosider Rd eller Re (se figur 22).



Figur 24. ESI/MS ioner af ginsenosidet Rg1.

Fragmenterne på 1227,5 og 1185,6 med et tab på hhv. 44  $[\text{M} + \text{K} - \text{CO}_2]^+$  og 86  $[\text{M} + \text{K} - \text{malonyl}]^+$  indikerer at der kan være tale om et malonyl konjugat. De resterende fragmentationer kunne ikke umiddelbart relateres til ginsenosid-relaterede sakkarider. Intensiteten af fragmentationerne tillod ikke optagelse af et  $\text{MS}^3$  spektrum til afklaring af dette.



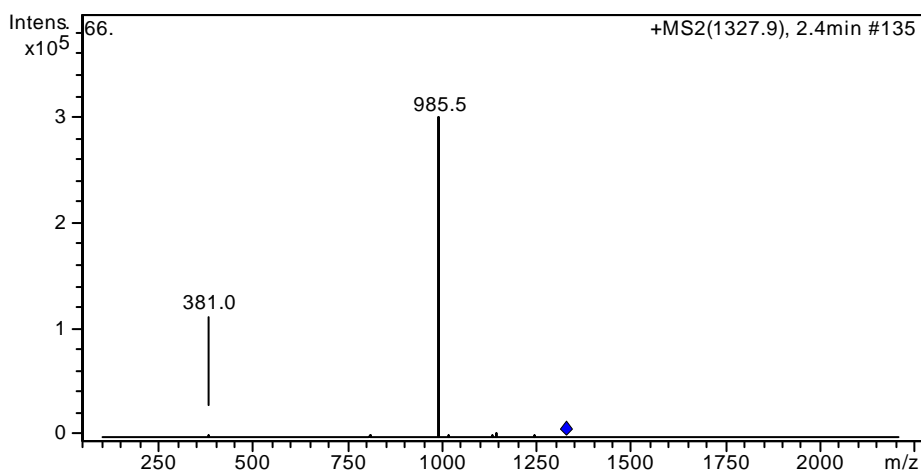
Figur 25 ESI/MS og ESI/MS-MS af  $m/z$  1271.5.

Det er tidligere observeret (Cui et al, 2001) at kalium addukter giver anledning til færre og meget svage fragmentationer, hvilket syntes at gøre sig gældende her.

ESI/MS-MS af ionen ved  $m/z$  1327,7 gav et dominerende fragtment ved 985,5 samt et svagt ved  $m/z$  381, figur 26. Som tidligere nævnt er  $m/z$  985,6 kalium adduktet af ginsenosider Rd eller Re og  $m/z$  381 er kalium adduktet af disakkaridet GlcGlc (se tabel 4).

Fragmentationsmønstret tyder på at  $m/z$  1327,7 kan være enten Rd eller Re med et ekstra diglycosid (GlcGlc), hvilket ikke tidligere er beskrevet i litteraturen.

Endelig identifikation af disse to ioner må afvente opkoncentrering og kromatografisk separation med efterfølgende MS analyse eventuelt suppleret med NMR analyse af det oprensede stof.



Figur 26 ESI/MS-MS af ionen ved m/z 1327,7

#### Proceskæde-behandlingsprøver

Prøverne fra behandlingsforsøget blev, som beskrevet for råprøverne, indledningsvis filtreret, fortyndet 1:100 i 30 % acetonitril og efterfølgende analyseret ved ESI/MS. Kvalitativt inderholder spektrene i større eller mindre grad de samme ginsenosider og sakkarider som identificeret i råprøven, figur 27. Dominerende ginsenosider er Rg1, Re eller Rd, og Rb1 ved hhv. m/z 839,4, 985,5, og 1147,6.

Af sakkarid-relaterede ioner observeres der kun di- og triglucosider ved m/z 381,1 og 543,2. I prøverne 8-1-A og 8-2-A er de dominerende ioner glucosider ved m/z 219,0 og 381,4 og der observeres kun et ringe indhold af ginsenosider. Færre ginsenosid-relaterede ioner skyldes antageligt forskel i koncentrationen i de forskellige ekstrakter samt ion-suppression fra de mere intense sakkarid-ioner.

Ekstrakter af ginsengbær (fraktion 10) havde en rød-violet farve og gav anledning til et andet ion-mønster end rod behandlingsprøverne, se figur 28. Af ginsenosider observeres intensive enkeltladede ioner af Rg1, Rd, Rb2, og mRb2 ved hhv. m/z 839,5, 985,6, 1117,6, og 1203,6. Desuden observeres en forholdsvis intens dobbeltladet ion af mRb2,  $[mRb2 + K]^{2+}$  ved m/z 621,4.

Udover ginsenosider observeres de førnævnte mono- og disakkarider samt en del intense ioner omkring m/z 400. CID spektre af disse ioner kunne ikke relateres til ginsenosider eller sakkarider og forekommer ikke i rodekstrakterne.

#### Opsummering

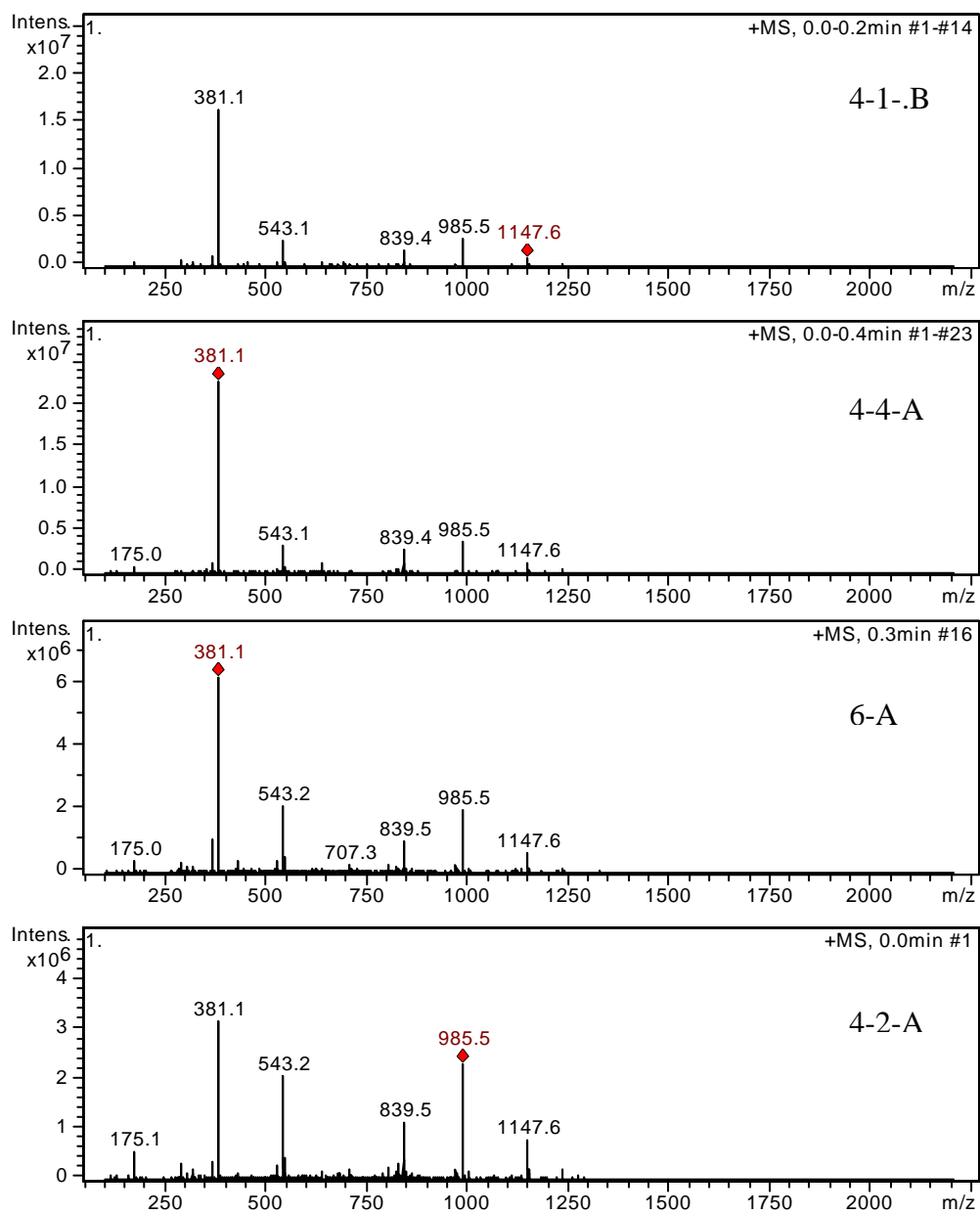
De primære komponenter i de vandige ekstrakter af ginsengrødder udgøres af ginsenosider Rb1, Re eller Rd, Rg1 og malonyl-Rb<sub>1</sub> samt mono- og oligosakkarider af glucose. Derudover findes der et mindre indhold af to ukendte stoffer, der tilsyneladende er ginsinosider ikke tidligere beskrevet i litteraturen. Der observeres ingen eller ringe indflydelse af proceskædens behandlinger på det kvalitative indhold af ginsenosider.

Det er i litteraturen beskrevet at ginsenosidet Re har en væsentlig antihyperglycemisk effekt (Attele et al, 2002). Den mest dominerende ginsenosid-relaterede ion i samtlige spektre udgøres tilsyneladende af Re ( $m/z$  985,5) hvilket understøtter den antihyperglycemiske effekt af vandige ekstrakter vist i tidligere studier.

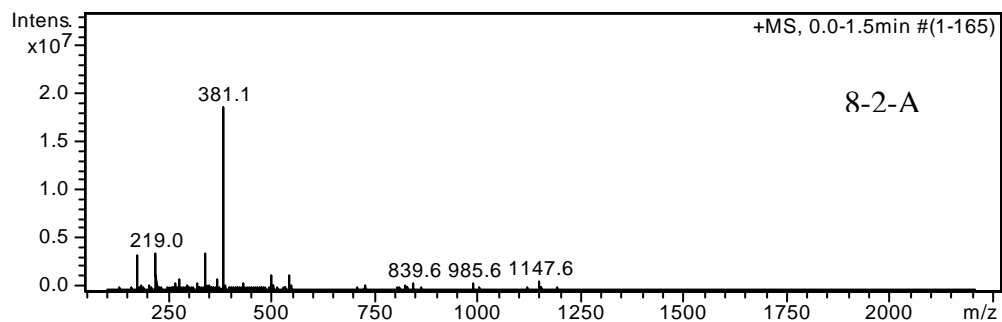
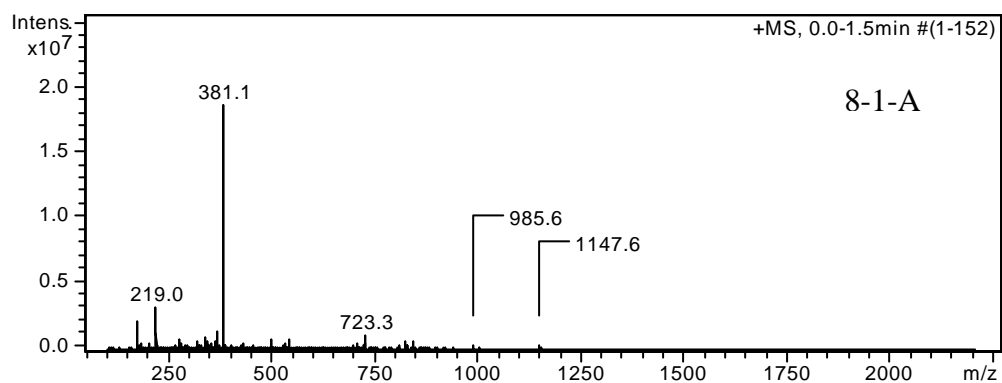
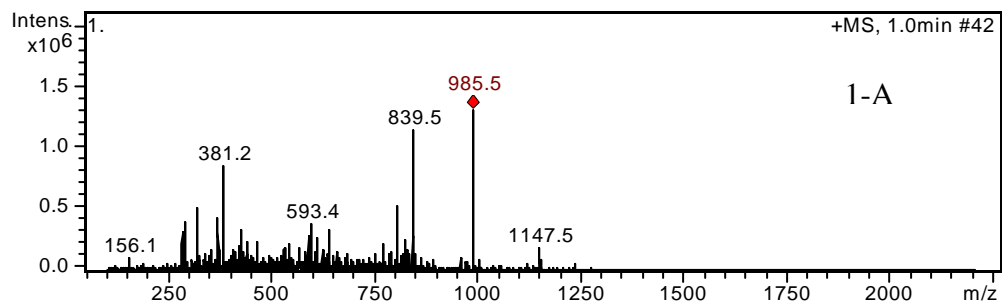
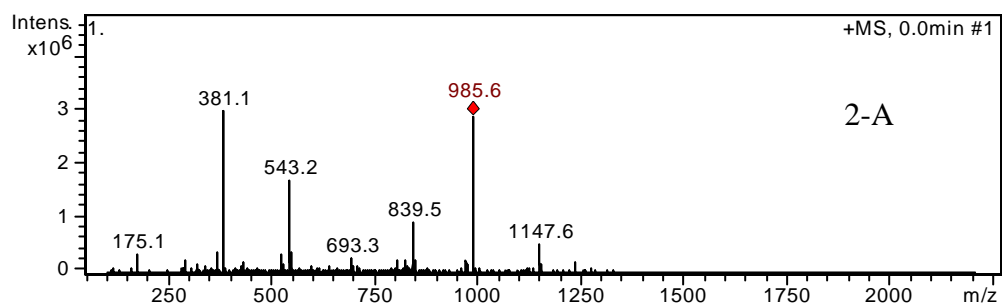
Der er ligeledes i litteraturen beskrevet bioaktive polysakkarider (glukaner) med masser på mw 14000-21000 med antihyperglycemisk effekt (f. eks. Tomodo et al 1984; Ma et al., 1998). Polysakkarider af den størrelse falder udenfor det dynamiske masse område ( $m/z$  50-2200) med den her anvendte ESI-ionfælde og de er generelt vanskelige at analysere selv med moderne massespektrometrisk udstyr – de 'flyver' simpelthen for dårligt og har for få ladninger til at kunne ioniseres og detekteres ved ESI.

Indledende MALDI-MS analyser, der har et større dynamisk masseområde end ESI, viste ingen ioner med  $m/z$  større end 1300 hvilket underbygger ovennævnte konklusion (data ikke vist). Fraværet af polysakkarider i analyserne kan også skyldes at de kun er tilstede i meget små mængder og derefor falder under detektionsgrænsen. På baggrund af de her anvendte metoder er det derfor ikke muligt at afvise om der i vandige ekstrakter findes større polysakkarider, som kan have en synergistisk virkning sammen med ginsenosider. Isolering og identifikation af større polysakkarider i vandige ekstrakter vil kræve yderligere studier med udvikling af gel-baserede oprensings- og separationsmetoder.

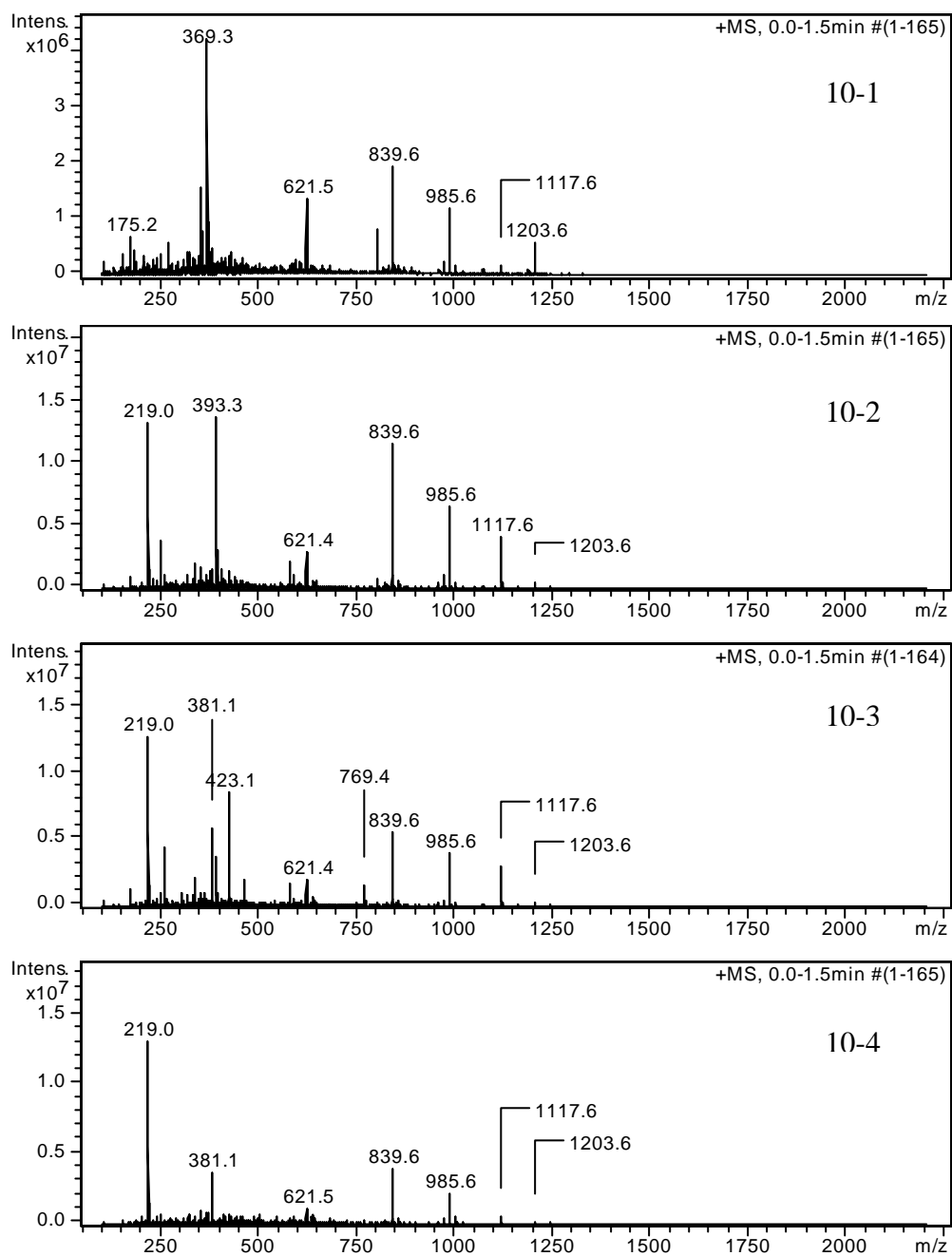




Figur 27 ESI/MS spektre af lagringsprøverne 4-1-B, 4-4-A, 6-A, 4-2-A, 2-A, 1-A, 8-1-A og 8-2-A



Figur 27 fortsat



Figur 28 Prøverne 10-1 og 10-4 er vandige ekstrakter, mens 10-2 og 10-3 er methanol ekstrakter.

## Litteratur

Cui, M; Song, FR; Liu, ZQ; Liu, SY, 2001, Metal ion adducts in the structural analysis of ginsenosides by electrospray ionization with multi-stage mass spectrometry, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 15((8), p. 586-595

Ji, QC; Harkey, MR, Henderson, GL; Gershwin, ME; Stern, JS; Hackman, RM, 2001, Quantitative determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, PHYTOCHEMICAL ANALYSIS, 12(5) p. 320-326

Ma, XL; Hao, CY; Lu, SX; Sun, YX; Liu, JZ; Liu, SY, 1998, Isolation and characterization of a bioactive polysaccharide from Panax quinquefolium L., CHEMICAL RESEARCH IN CHINESE UNIVERSITIES, 14(2), p. 143-146

Miao, XS; Metcalfe, CD; Hao, CY; March, RE, 2002, Electrospray ionization mass spectrometry of ginsenosides, JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY 37(5), p. 495-506

Tomoda, M, Shimada, K; Konno, C; Sugiyama, K; Hikino, H, 1984, Antidiabetes drugs .2. Partial structure of panaxan-a, a hypoglycemic glycan of panax-ginseng roots, PLANTA MEDICA, 50(5), p. 436-438

## Konklusion og videre perspektiver

Projektets resultater har givet en bred oversigt over hvad der sker med de bioaktive grupper samtidigt gennem hele proceskæden i ginseng, og dermed bidraget til at udpege og konsolidere de mest fordelagtige metoder for håndtering. I samme proces har vi opnået bred indsigt i stabilitetsforhold hos de enkelte stoffer og stofgrupper, hvilket er grundlaget for den videre optimering i forhold til enkeltstofgrupper. De 9 ukendte ginsenosider fra HPLC analyserne og de 2 ukendte ginsenosider fra SDUs analyser, som måske er helt nye ikke tidligere identificerede ginsenosider, repræsenterer et behov for fortsat identifikation af stoffer. Flere af disse findes dog i begrænsede koncentrationer, mens effekterne biologisk set er ukendte. De dramatiske ændringer i ginsenosidprofilen efter dampbehandlingen er overraskende og tilkendegiver at nogle af de vigtige stofgrupper, som vides at være meget biologiske aktive, f.eks. Re i forbindelse med Diabetes II og blodsukkerregulering, tilsyneladende ikke kan være årsagen til den generelle opfattelse af at 'rød' dampet ginseng er mere potent og kraftigere end hvid ginseng. Andre stoffer, måske nogle af de nydannede, må være centrale i denne kraftigere effekt.

For polysakkarider har der med de tilrådighedværende metoder været fokuseret særligt på de mindre sukkermolekyler, og her fremkommer sukkerdelene på ginsenosiderne tydeligt i spektrene. Ginsenosider består jo netop af et aglycon (ginsenoid) med forskellige sukkergrupper koblet på. Også andre små sukkerarter er dog identificeret og beskrevet i prøverne. Prøverne viser, at der ikke er den store kvalitative udskiftning i ginsenosider ved de forskellige behandlinger, som også er bekræftet i HPLC analyserne. Spectro spray MS identifikation vil være en interessant metode til kvalitativ identifikation af nye ginsenosider, men vil ikke kunne bruges til præcis kvantificering af indholdsstoffernes koncentration.

Sammenfattende har projektet bidraget til udvikling af analysemetoder og basis viden om, hvad der sker i detaljer undervejs i behandlingen af ginseng rødder fra høst og frem til forskellige færdige ginseng droger/produkter. Indsigt i behandlingsafhængige ændringer i detailstoffer er af stor betydning for plantemedicin og kosttilskudsområdet, da den er grundlaget for optimering og sikring af bedst mulige kvalitet. De beskrevne metoder og analyser giver samtidig en ramme for en mere detaljeret varedeklaration fremover for ginseng produkter, som vil være en stor og afgørende fordel i videre forskning, herunder især i beskrivelsen og forståelsen af vigtigheden af indholdet i ginseng præparater i kliniske forsøg. Hvis ikke vi ved præcis hvilke og hvor meget aktivstof, der er i et testpræparat, bliver det vanskeligt eller umuligt at forstå variationer i kliniske effekter.

## Videre formidling

Projektets resultater er beskrevet i detaljer i denne slutrapport og yderligere skriftlig formidling er planlagt. Trine Nordqvists undersøgelser vil blive trykt i UdviklingsCenter Aarslevs projektavis i efteråret 2006. De generelt opnåede data og resultater er af en karakter, så der kan blive basis for mindst en videnskabelig artikel på baggrund af projektet. Projektpartnerne har ved forskellige lejligheder nævnt aspekter omkring dette projekt, og vil fremover desuden søge mulighed for at formidle projektet og dets resultater mundtligt i relevante brugerfora.

## Acknowledgement

Projektet er finansieret af Videnskabsministeriet, Fyns Amt og medfinansieret af Kongshave Ginseng, Gartneriet Timmermann og gartner Palle Fabricius.